



Zélia Ribeiro Alves

Funcionalização de pectinas e sua aplicação na indústria alimentar



Zélia Ribeiro Alves

Funcionalização de pectinas e sua aplicação na indústria alimentar

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Ramo Bioquímica Alimentar, realizada sob orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Engenheira Pilar Filipa Ribeiro Valinhas Morais, Diretora do Departamento de Inovação da Frulact S.A.

o júri

presidente

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva

professor associado com agregação do Departamento de Química Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Mestre Pilar Filipa Ribeiro Valinhas Morais

diretora do Departamento de Inovação Frulact S.A.

agradecimentos

Agradeço à Frulact S.A. pelo acolhimento e oportunidade de realização do estágio curricular.

Ao meu orientador Prof. Doutor Manuel António Coimbra pela dedicação, empenho, disponibilidade e conhecimentos que me foram transmitidos.

À Eng. Pilar Morais e ao Doutor Domingos Almeida pelo tema que me propuseram, pela preocupação e constante acompanhamento.

À Doutora Cláudia Nunes pela preciosa ajuda e acompanhamento no laboratório da Universidade de Aveiro.

À equipa da Frulact, em especial à Cláudia Lopes e Helena Gomes pelo auxílio e amizade prestado em todo o percurso de estágio.

Aos meus pais, irmão e amigos por todo o apoio, motivação e força que me transmitiram.

palavras-chave

Pectinas; Polpas de Fruta; Viscosidade; Pectina metil-esterase; Desesterificação; Preparados de Fruta; Aplicação alimentar

resumo

Este trabalho, desenvolvido na empresa alimentar Frulact, consistiu no estudo de algumas polpas de frutos com vista à sua utilização em preparados de fruta para aplicação em iogurte.

Os polissacarídeos pécticos, presentes nas polpas dos frutos, foram sujeitos a reações enzimáticas e não enzimáticas. Os tratamentos aplicados às polpas comerciais foram a adição de 1% (m/m) de CaCl_2 , 0,1% (m/m) da enzima pectina metil-esterase (PME) e incubação da PME na presença de CaCl_2 . Para as polpas comerciais, sem tratamento, foi realizado um estudo da viscosidade em função da concentração (100, 80, 60, 40 e 20%), tendo-se verificado que esta relação é exponencial com o aumento da concentração de polpa. Quando aplicados os tratamentos, verificou-se que estes apresentaram vantagens em toda a gama de frutos estudada.

No estudo realizado à suspensão de pedaços de morango em várias diluições de polpa (80, 60, 40 e 20%) verificou-se também que alguns tratamentos aplicados às polpas apresentaram vantagens em relação à polpa controlo, sendo possível garantir a suspensão de pedaços com uma concentração mais baixa de polpa.

As polpas de frutos obtidas por frutas frescas, morango e alperce, foram também submetidas aos mesmos tratamentos das polpas comerciais, tendo-se estudado o efeito da pasteurização prévia das polpas frescas. Verificou-se para as polpas frescas de morango e alperce que o melhor tratamento foi a aplicação da PME na polpa não pasteurizada. Foi definido uma gama de temperatura e tempo de tratamentos para a ação da PME em que a viscosidade se mantinha constante, permitindo assim obter produtos homogéneos. As polpas de Alperce e Morango funcionalizadas com a PME foram aplicadas a preparados de polpa, sendo a sua aplicação vantajosa, uma vez que se conseguiu reduzir a adição de amido, utilizado como espessante no preparado. Em preparados de fruta com pedaços, foi possível desenvolver uma fórmula, sem o uso de aditivos, e com viscosidades semelhantes a preparados de pedaços com aditivos. A análise sensorial aos preparados mostrou serem aceitáveis do ponto de vista de textura e viscosidade.

keywords

Pectins; Fruit Pulp; Viscosity; Pectin methyl-esterase, Deesterification; Fruit Preparation; Food Application

abstract

The goal of this investigation developed in Frulact, a food company, was the study of selected fruit pulps aiming their use as fruit ingredient for yogurts.

The pectic polysaccharides, constituents of fruit pulp, were submitted to enzymatic and non-enzymatic reactions. The treatments used in the commercial pulps were the addition of 1% (w/w) of CaCl_2 , 0,1% (w/w) of Pectinmethylesterase (PME), and the incubation of PME with CaCl_2 . The viscosity of different concentrations (100, 80, 60, 40 and 20%) of commercial pulps without treatment showed an exponential relationship with the increase of pulp concentration. These treatments were found to be advantageous in all range of pulps studied.

In a study performed with a suspension of strawberries pieces in different pulp concentrations (80, 60, 40 e 20%), it was observed that some of the treatment applied had also advantages compared to the control pulp, as it was possible to ensure the suspension of pieces in lower concentration of pulp.

The pulps obtained from fresh fruits, strawberry and apricot, undergone the same treatments applied to the commercial pulps. Furthermore, it was studied the effect of pasteurization of the fresh pulps before treatment. It was observed that the best treatment to the strawberry and apricot pulp were the application of the PME to the non-pasteurized pulp.

A time and temperature range for PME action was defined allowing to maintain the same viscosity of pulps and consequently their homogeneity. The pulps of Apricot and Strawberry treated with the PME were used in fruit preparations, allowing to observe that their utilization was advantageous, since they allowed the reduction of the starch added to the preparation. In fruit preparation with pieces, it was possible to develop a formula free of additives with similar rates of consistency of fruit pieces prepared with additives. The sensorial analysis showed that the texture and viscosity were defined as acceptable.

Índice

Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas.....	V
Índice de Abreviaturas	VII
1. Apresentação da Frulact	1
2. Introdução.....	2
2.1 Polissacarídeos pécticos – localização, função e estrutura.....	3
2.1.1 Pectinas Comerciais	5
2.1.2 Aplicação na indústria alimentar.....	6
2.1.3 Legislação.....	7
2.2 Mecanismos de gelificação dos polissacarídeos pécticos	7
2.2.1 Gelificação das pectinas.....	8
2.2.2 Gelificação dos ácidos pécticos.....	10
2.3 Mecanismos de reações enzimáticas e não enzimáticas.....	13
2.3.1 Mecanismos de reações enzimáticas	14
2.3.2 Mecanismos de reações não enzimáticas	18
2.4 Aplicações dos polissacarídeos pécticos na indústria alimentar	20
2.4.1 Bebidas à base de fruta.....	21
2.4.2 Bebidas lácticas ácidas.....	21
2.4.3 Geleias e compotas.....	22
2.4.4 Preparados de Fruta.....	23
3. Contextualização do tema com o trabalho a realizar	26
3.1 Análise de Mercado.....	26
4. Materiais e Métodos	30
4.1 Amostras.....	30
4.1.1 Preparação das amostras de polpas comerciais	31
4.1.2 Preparação das amostras de polpas frescas	31
4.2 Métodos de tratamento das polpas	31
4.2.1 Adição de Cloreto de Cálcio (CaCl_2)	32
4.2.2 Adição de Pectina-metilesterase (PME).....	32
4.2.3 Adição de Cloreto de Cálcio e Pectina-metilesterase.....	33
4.3 Desenvolvimento de preparados à base de fruta	33

4.3.1	Preparado de polpa de morango	33
4.3.2	Preparado de polpa de Alperce.....	37
4.3.3	Preparados <i>FruitOnly</i>	39
4.4	Avaliação da capacidade de suspensão de pedaços e presença de sinerese	43
4.5	Análises físico-químicas	43
4.5.1	Teor de sólidos solúveis (TSS).....	43
4.5.2	pH.....	44
4.5.3	Análise de açúcares	44
4.5.4	Viscosidade	47
4.6	Análise Sensorial.....	48
4.7	Análise Estatística	48
5	Resultados e Discussão	49
5.1	Caracterização de polpas comerciais.....	49
5.1.1	Teor de sólidos solúveis	49
5.1.2	pH.....	50
5.1.3	Análise de Açúcares	50
5.1.4	Viscosidade	53
5.2	Influência do tipo de tratamento nas polpas	56
5.2.1	Polpas comerciais.....	56
5.2.2	Polpas frescas	66
5.3	Otimização da ação da PME na viscosidade das polpas	73
5.4	Avaliação da capacidade de suspensão de pedaços.....	76
5.5	Desenvolvimento de preparados à base de fruta	80
5.5.1	Preparados de polpa	80
5.5.2	Preparados <i>FruitOnly</i>	88
6	Conclusão	95
7	Referências.....	98
8	Anexos.....	104
8.1	– Tabela dos níveis de significância para o teste de comparação pareada [109]	104

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação da estrutura de um polissacarídeo péctico com domínios de homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana do tipo I (RG-I), xilogalacturonana (XGA) e ramonogalacturonana do tipo II (RG-II) (Adaptado de [3]).	3
Figura 2 - Mecanismo de formação do gel a partir de polissacarídeos pécticos – a) ligação iónica entre os grupos carboxílicos dissociados e o ião cálcio; b) interações hidrofóbicas; c) ligações de hidrogénio entre grupos carboxílicos não dissociados (Adaptado de [28]).	8
Figura 3 – Representação do modelo de “caixa-de-ovos” dos ácidos pécticos. 1) Agregado de dímeros; 2) Dímero; 3) interação eletrostática do ião cálcio com os grupos carboxílicos desesterificados (Adaptado de [1]).	10
Figura 4 - Possíveis reações de modificação nas cadeias de polissacarídeos pécticos. Reações enzimáticas (vermelho) e reações não enzimáticas (verde) (Adaptado de [49]).	14
Figura 5 - Representação da reação de hidrólise ácida nos polissacarídeos pécticos (Adaptado de [22]).	18
Figura 6 – Representação da reação de β -eliminação nos polissacarídeos pécticos (Adaptado de [22]).	19
Figura 7 - Representação da desesterificação química nos polissacarídeos pécticos (Adaptado de [22]).	20
Figura 8- Observação da suspensão de partículas no sumo de laranja com (imagem à esquerda) e sem a adição de pectina (imagem à direita). A pectina mostra capacidade de impedir a sedimentação da polpa do fruto [68]	21
Figura 9 - Esquema da ação da pectina na estabilização das κ -caseínas com a diminuição do pH. Ocorre uma adsorção das pectinas à superfície das micelas evitando a sua agregação (Adaptado de [69]).	22
Figura 10 - Exemplos de compotas e geleias nas quais a pectina tem um papel fundamental.	23
Figura 11 - Top 15 dos conceitos que transmitem aos alimentos e bebidas não alcoólicas a ideia de saudável. Estudo realizado na Europa, pelo grupo <i>Mintel</i> , de janeiro a setembro de 2012 [71].	27
Figura 12 – Representação da viscosidade, à temperatura ambiente, em função da concentração de polpa presente na solução. A – Polpa de Morango_1; B – Polpa de Morango_5; C – Polpa de Maçã; D – Polpa de Manga; E – Polpa de Marmelo; F – Polpa de Mirtilo; G – Polpa de Limão; H – Polpa de Kiwi.	55
Figura 13 - Apresentação da viscosidade das polpas comerciais, à temperatura ambiente, para todas as concentrações e tratamentos estudados, respetiva análise estatística. A – Polpa de Morango_1; B – Polpa de Morango_5; C – Polpa de Maçã; D – Polpa de Manga; E – Polpa de Marmelo; F – Polpa de Mirtilo; G – Polpa de Limão; H – Polpa de Kiwi. (Nota: Não estão representados valores da viscosidade para algumas polpas nas concentrações de 100, 80 e 60% com o tratamento CaCl_2 e $\text{CaCl}_2 + \text{PME}$ porque a solução de polpa gelificou, não tendo sido realizada a sua medição.)	62
Figura 14 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Morango_1 na ausência e presença de tratamento	64
Figura 15 - Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Morango_5 na ausência e presença de tratamento	64
Figura 16 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Maçã na ausência e presença de tratamento	64

Figura 17 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Manga na ausência e presença de tratamento	65
Figura 18 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Marmelo na ausência e presença de tratamento	65
Figura 19 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Mirtilo na ausência e presença de tratamento	65
Figura 20 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Limão na ausência e presença de tratamento	66
Figura 21 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Kiwi na ausência e presença de tratamento	66
Figura 22 – Apresentação da viscosidade da polpa de morango pasteurizada e não pasteurizada na presença dos tratamentos e respetiva análise estatística. (Nota: O tratamento com o CaCl_2 na presença de PME provocou a gelificação da polpa pasteurizada e não pasteurizada, por este motivo o resultado de viscosidade não está apresentado.)	71
Figura 23 - Apresentação da viscosidade, à temperatura ambiente, da polpa de alperce pasteurizada e não pasteurizada na presença dos tratamentos e respetiva análise estatística. (Nota: O tratamento com o CaCl_2 na presença de PME provocou a gelificação da polpa pasteurizada e não pasteurizada, por este motivo o resultado de viscosidade não está apresentado.).....	73
Figura 24 - Viscosidade da polpa de morango, à temperatura ambiente, em função do tempo e temperatura de incubação com a enzima PME, respetiva análise estatística associada	75
Figura 25 - Resultados da viscosidade da polpa de alperce, à temperatura ambiente, em função do tempo e temperatura de incubação com a enzima PME, respetiva análise estatística associada	76
Figura 26 - Gráfico da percentagem de preferência de cada preparado com pedaços de morango (A) e alperce (B)	94

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Conteúdo de polissacarídeos pécticos (%) em alguns frutos [1, 6].....	6
Tabela 2 – Apresentação de alguns produtos com o mesmo posicionamento de mercado ao desenvolvido [73]......	29
Tabela 3 - Características das polpas comerciais	30
Tabela 4 - Formulação de preparado industrial de polpa de morango açucarado	33
Tabela 5 - Formulação de preparado industrial de polpa de morango edulcorado.....	34
Tabela 6 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado açucarado à base de fruta com polpa de morango não pasteurizada e sujeita ao tratamento com PME.	35
Tabela 7 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado edulcorado à base de fruta com polpa de morango não pasteurizada e sujeita ao tratamento com PME.	35
Tabela 8 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado açucarado à base de fruta com polpa de morango pasteurizada após tratamento com a enzima PME.	36
Tabela 9 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado edulcorado à base de fruta com polpa de morango pasteurizada após o tratamento com a enzima PME.	36
Tabela 10 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado açucarado à base de fruta com polpa de alperce não pasteurizada após tratamento com PME.	37
Tabela 11 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado à base de fruta edulcorado com polpa de alperce não pasteurizada.	38
Tabela 12 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado açucarado à base de fruta com polpa de alperce pasteurizada após tratamento com a enzima PME.	38
Tabela 13 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado edulcorado à base de fruta com polpa de alperce pasteurizada.....	39
Tabela 14 - Formulações dos preparados tipo de morango com diferentes proporções de cada componente.	40
Tabela 15 - Formulações de preparados <i>FruitOnly</i> de Morango	41
Tabela 16 - Formulações dos preparados tipo de alperce com diferentes proporções de cada componente.	42
Tabela 17 - Formulações de preparados <i>FruitOnly</i> de alperce.....	42
Tabela 18 – Apresentação do teor de sólidos solúveis (°Brix) para cada polpa e suas diluições.	49
Tabela 19 – Apresentação dos valores de pH para cada polpa e suas diluições.....	50
Tabela 20 - Composição de açúcares dos AIR das diferentes polpas de frutos comerciais	51
Tabela 21 – Estimativas (\pm intervalo de confiança 95%) para os parâmetros do modelo de crescimento exponencial usado para descrever a viscosidade em função da concentração de polpa presente na solução à temperatura ambiente.	54
Tabela 22 - Resultados da viscosidade (média \pm desvio padrão) em função da concentração, tipo de tratamento para cada fruto e respetiva análise estatística.....	58
Tabela 23 – Parâmetros de pH e °Brix para a polpa de morango pasteurizada e não pasteurizada quando sujeita aos diferentes tratamentos.	67
Tabela 24 - Parâmetros de pH e °Brix para a polpa de alperce pasteurizada e não pasteurizada quando sujeita aos diferentes tratamentos.	68
Tabela 25 - Composição de açúcares dos AIR das polpas de frutos frescos.....	68

Tabela 26 – Apresentação dos valores da viscosidade (média±desvio padrão) em função do tipo de tratamento, tipo de polpa e respetiva análise estatística.....	70
Tabela 27 - Viscosidade das polpas em função do tempo e temperatura de incubação com a enzima PME e respetiva análise estatística.....	74
Tabela 28 - Comparação da suspensão de pedaços de morango, ao fim de 5 dias, na presença ou ausência dos diferentes tratamentos nas polpas comerciais	79
Tabela 29 - Resultados dos parâmetros do preparado industrial açucarado com e sem a adição de amido.....	81
Tabela 30 - Resultados finais dos preparados de fruta açucarados de morango com polpa pasteurizada e não pasteurizada após o tratamento com PME.....	81
Tabela 31 – Resultados dos parâmetros do preparado industrial edulcorado de morango com e sem a adição de amido.....	84
Tabela 32 - Resultados finais dos preparados de fruta edulcorado de morango com polpa de morango não pasteurizada e pasteurizada após tratamento com PME.....	84
Tabela 33 - Resultados finais dos preparados de fruta açucarados com polpa de alperce não pasteurizada e pasteurizada após tratamento com PME.....	86
Tabela 34 - Resultados finais dos preparados de fruta edulcorados com polpa de alperce não pasteurizada e pasteurizada após tratamento com PME.....	87
Tabela 35 – Parâmetros dos preparados tipo realizados para duas formulações diferentes de morango.....	90
Tabela 36 – Parâmetros de todas as formulações realizadas para o preparado de pedaços de morango.....	90
Tabela 37 - Parâmetros dos preparados tipo realizados para duas formulações diferentes de alperce	91
Tabela 38 - Parâmetros de todas as formulações realizadas para o preparado de pedaços de alperce	92

Índice de Abreviaturas

Á.Ur.	Ácidos Urónicos
AIR	Resíduos Insolúveis em Álcool
Ara	Arabinose
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GM	Grau de Metil-esterificação
IQF	Individual Quick Frozen
Man	Manose
MFF	m-fenilfenol
PG	Poligalacturonase
PL	Pectato Liase
PME	Pectina Metil-esterase
PMG	Polimetilgalacturonase
PMGL	Polimetilgalacturonase Liase
Rha	Ramnose
TSS	Teor de Sólidos Solúveis
Xyl	Xilose

1. Apresentação da Frulact

A Frulact, empresa fundada em 1987, é especializada no desenvolvimento e processamento de preparados de fruta para aplicação na indústria dos lacticínios, gelados, bebidas e pastelaria, conquistando a posição de líder ibérico. Esta empresa colabora com multinacionais como a Nestlé, Danone, Yoplait e Unilever e é constituída por um grupo de empresas situadas em Portugal (Maia, Ferro e Tortosendo), França, Marrocos, Argélia e África do Sul. Além da internacionalização, esta empresa agro-alimentar aposta na inovação, assegurando o desenvolvimento de novos produtos ou processos e possuindo um nível científico e tecnológico avançado. A unidade Frulact Maia é a sede administrativa da empresa e é onde se encontra, além da produção industrial, um centro de Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI) - Frutech. Aqui, existe uma unidade piloto com “*up-grade*” tecnológico, um laboratório de microbiologia alimentar e de caracterização físico-química, uma sala de provas e análise sensorial, bem como uma biblioteca técnico-científica. No Frutech são desenvolvidos muitos produtos servidos a milhares de consumidores, aplicando capacidades biotecnológicas, melhorando os produtos e preservando a sua qualidade nutricional e sensorial, tendo em conta a eficiência energética e o impacto ambiental. A capacidade de inovação e a sua flexibilidade para atender às necessidades dos clientes, reduzindo o *time-to-market*, tornam a Frulact uma empresa competitiva, onde se tenta antecipar as tendências de mercado e se criam novos produtos, acrescentando-lhes valor. Esta empresa trabalha em parceria com clientes, fornecedores e mantém um conjunto de projetos sob pesquisa interna ou em cooperação com universidades portuguesas da área das ciências alimentares.

Os produtos têm cada vez mais edições limitadas e um tempo de vida curto. Sendo assim, a Frulact aposta na pro-atividade, criatividade e inovação, desenvolvendo ideias e lançando novos produtos, tendo em conta a análise de mercado e a tendência e expectativa do consumidor.

2. Introdução

Os frutos e vegetais apresentam na sua parede celular polissacarídeos pécticos que, quando extraídos, são comercialmente usados na indústria alimentar como aditivos. A aplicação deste tipo de polissacarídeos tem revelado interesse do ponto de vista tecnológico devido à sua organização estrutural e à sua funcionalidade. Apesar dos polissacarídeos pécticos conterem uma estrutura bastante complexa, quando extraídos industrialmente dos frutos apresentam uma estrutura mais simplificada [1-3]. Comercialmente, estes polissacarídeos são divididos em pectinas de alta e baixa metil-esterificação, sendo o termo pectina usado para classificar ambos os tipos de estrutura [1, 2]. No entanto, a Sociedade Química Americana, classifica o grupo dos polissacarídeos pécticos, de acordo com o seu grau de metil-esterificação, em: (a) ácidos pécticos (pectato), à cadeia de galacturonanas com quantidades negligenciáveis de grupos metílicos esterificados [4-6]; (b) ácidos pectínicos (pectinatos), às moléculas que apresentam quantidades variáveis de grupos metílicos na cadeia de galacturonanas. Esta molécula é capaz de gelificar na presença de açúcar e pH ácido, ou se o conteúdo de grupos metílicos for baixo na presença de iões cálcio [4-6]; (c) pectinas (polimetilgalacturonato), polissacarídeos pécticos que apresentam pelo menos 75% de grupos metílicos na sua estrutura [4-6]. Tendo em conta as diferentes classificações referidas, ao longo deste trabalho, serão diferenciadas como pectinas, os polissacarídeos que apresentam um grau de metil-esterificação acima de 50% e como ácidos pécticos, os polissacarídeos com um grau de metil-esterificação abaixo de 50%. Como consequência da diferença estrutural destes dois polissacarídeos, a sua ação como agente gelificante, espessante e estabilizante promove a sua aplicação na indústria alimentar de uma forma diversificada [3, 7, 8].

Neste trabalho será abordado o conceito de polissacarídeos pécticos, os mecanismos de gelificação, reações enzimáticas e não enzimáticas que ocorrem em torno da sua estrutura, bem como exemplos da sua aplicação na indústria alimentar.

2.1 Polissacarídeos pécticos – localização, função e estrutura

Os polissacarídeos pécticos representam uma família de hidratos de carbono com uma estrutura muito complexa, os quais representam na natureza cerca de um terço das paredes celulares primárias de plantas superiores (frutos e vegetais), estando presentes em maior quantidade na lamela média. Na parede celular estão associados a outros componentes como a celulose e hemiceluloses. Estes polímeros têm um papel importante no crescimento e desenvolvimento das plantas, na porosidade e na estrutura da parede celular, na adesão entre células bem como na sinalização em defesa da célula [9-12]. A composição dos polissacarídeos pécticos depende da fonte onde se encontra, do armazenamento e do método de extração. Estruturalmente contêm entre centenas a mil resíduos de açúcares, o que corresponde a pesos moleculares de 50 a 150 kDa [7, 13].

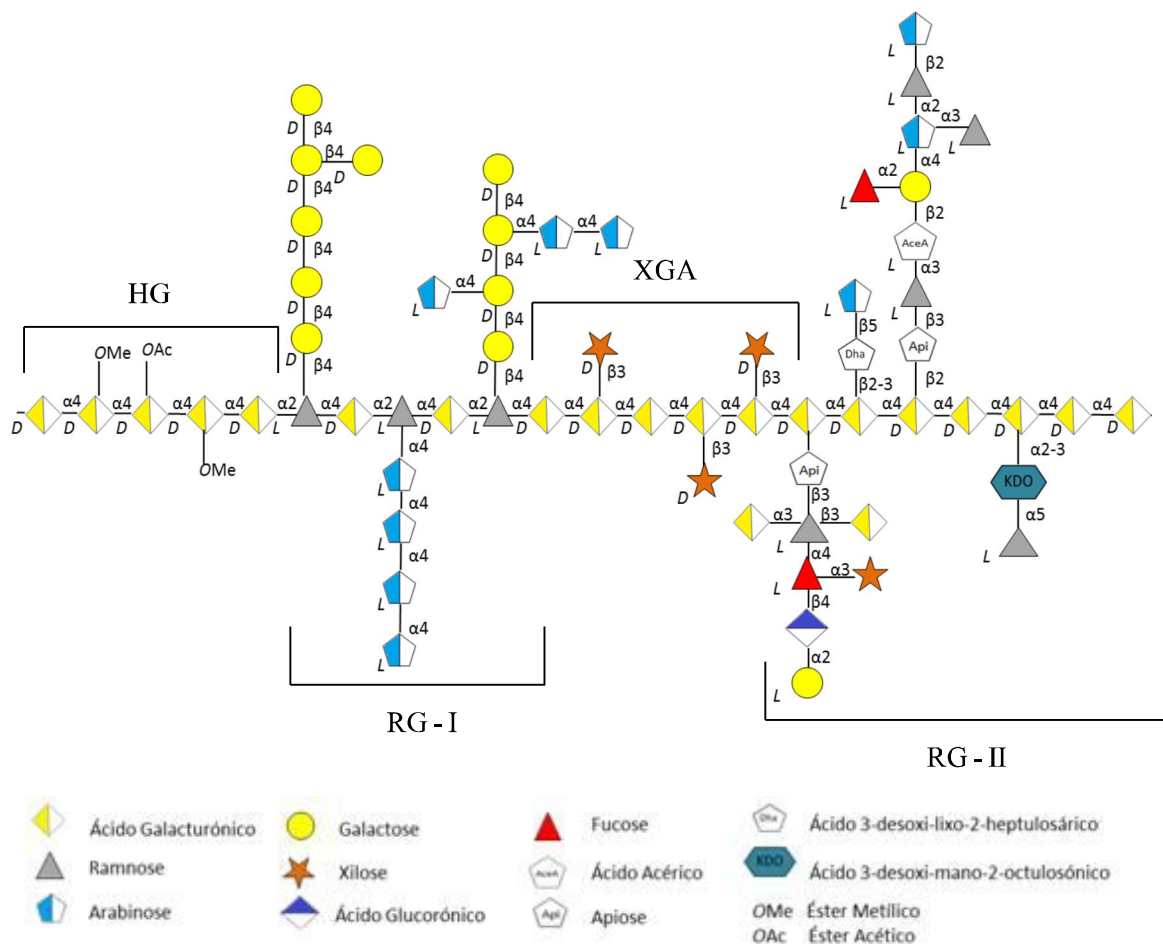


Figura 1 – Representação da estrutura de um polissacarídeo péctico com domínios de homogalacturonana (HG), ranogalacturonana do tipo I (RG-I), xilogalacturonana (XGA) e ramonogalacturonana do tipo II (RG-II) (Adaptado de [3]).

Apesar da diversidade e complexidade estrutural dos polissacarídeos pécticos, são reconhecidos quatro domínios principais e distintos: homogalacturonana (HG), xilogalacturonana (XGA), ramnogalacturonana do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonana do tipo II (RG-II) (**Figura 1**). Estes domínios estão ligados covalentemente uns aos outros formando os polissacarídeos pécticos [10, 14]. A HG é o domínio mais abundante e consiste numa cadeia longa e linear de resíduos de ácido galacturónico unidos por ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4). Estes resíduos podem ser acetilados em O-2 e O-3 ou apresentar metil-esterificação no grupo carboxílico C₆. A HG também é chamada de região lisa (*smooth region*) [3, 7, 9, 13, 15, 16]. A XGA apresenta a mesma estrutura da cadeia principal da HG, mas é substituída por resíduos de xilose no C₃ dos resíduos de ácido galacturónico [17, 18]. A RG-I representa uma cadeia principal constituída por unidades de resíduos de dissacarídeos repetidos [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)], em que os resíduos de ramnose são substituídos em C₄ por cadeias laterais de açúcares neutros (galactose e arabinose). Estas cadeias laterais têm apresentado polímeros lineares ou ramificados que variam no número de resíduos. Sendo assim, a RG-I apresenta elevada heterogeneidade entre plantas [3, 7, 9, 15]. A RG-II representa o polissacarídeo péctico estruturalmente mais complexo. No entanto, a sua estrutura é conservada entre diferentes espécies de plantas. A cadeia principal da RG-II é semelhante à HG, apenas com resíduos de ácido galacturónico. Contudo, estes encontram-se ramificados com cadeias laterais que apresentam na sua constituição alguns resíduos de açúcares menos comuns (apiose (Api), ácido acérico, ácido 3-desoxi-lixo-2-heptulosárico (DHA) e ácido 3-desoxi-mano-2-octulosónico (KDO)). Ambas as cadeias de RG são chamadas de região ramificada (*hairy regions*) dos polissacarídeos pécticos [3, 7, 9, 14, 15].

A razão molar entre os grupos metil esterificados por 100 resíduos de ácido galacturónico é definida como o grau de metil-esterificação (GM) [9, 19].

Os polissacarídeos pécticos apresentam um comportamento polieletrólito, sendo o seu pKa variável com o pH presente na matriz. A pH neutro, os resíduos do ácido galacturónico estão dissociados, apresentando carga negativa. Por outro lado, com a diminuição do pH, os resíduos ficam protonados. Devido a este comportamento, o pKa intrínseco da cadeia péctica é muito variável (2,9 – 3,3) mas aproxima-se do pKa do ácido galacturónico, que é 3,5 [2].

2.1.1 Pectinas Comerciais

A presença dos polissacarídeos pécticos nas plantas torna-as a principal matéria-prima para a extração das pectinas comerciais. No entanto, nem todos os polissacarídeos pécticos têm a mesma capacidade de gelificação, devido às suas diferentes características estruturais (grau de metil-esterificação e massa molecular). Desta forma, a sua presença nos frutos e vegetais não os qualifica diretamente com valor comercial [1, 11]. A polpa da maçã e as cascas dos frutos cítricos são tradicionalmente os frutos mais usados para a extração ácida deste tipo de polissacarídeo. Estas matérias-primas são sub-produtos dos sumos de frutas industriais e apresentam elevada percentagem de polissacarídeos pécticos (**Tabela 1**) [11, 19].

As pectinas comerciais sofrem um processo de extração industrial severo, onde ocorrem reações de desesterificação e despolimerização, quebrando algumas das cadeias laterais compostas por açúcares neutros e diminuindo a massa molecular dos polissacarídeos pécticos [13, 19]. Deste processo são obtidas cadeias de resíduos de ácido galacturónico com grau de metil-esterificação superior a 50% (pectinas), sendo uma cadeia galacturónica de baixo grau de metil-esterificação (ácidos pécticos) obtida por uma desesterificação ácida ou básica de forma controlada. Como resultado destas modificações estruturais, as pectinas comerciais são tipicamente representadas pela estrutura da HG [20]. Industrialmente, existem as chamadas pectinas amidadas, obtidas através de uma reação heterogénea nos ácidos pécticos na presença de amónia e metanol, à temperatura ambiente. Este tipo de pectina comercial apresenta cerca de 15 a 25% de grupos amina na posição C₆ dos grupos carboxílicos dos resíduos de ácido galacturónico [2, 19-21].

De acordo com as normas europeias, as pectinas comerciais têm que apresentar pelo menos 65% de resíduos de ácido galacturónico por peso da amostra e podem variar umas das outras pela presença de substituintes, como ésteres metílicos ou amidas em C₆ e presença de grupos acetilo ligados aos grupos hidroxilo dos resíduos de ácido galacturónico [3, 19]. As diferentes características estruturais permitem a utilização das pectinas comerciais em diversos sistemas alimentares como agente gelificante, espessante e/ou estabilizante [13].

Tabela 1 - Conteúdo de polissacarídeos pécticos (%) em alguns frutos [1, 6].

Fruto	Percentagem de polissacarídeos pécticos em matéria fresca (%)
Maçã (<i>Malus sp</i>)	0,5 – 1,6
Banana (<i>Musa acuminata</i>)	0,7 – 1,2
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	1,0
Casca de maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	2,1 – 3,0
Polpa de limão (<i>Citrus lemon</i>)	2,5 – 4,0
Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	0,2 – 0,4
Pêssego (<i>Prunus persica</i>)	0,1 – 0,9
Morango (<i>Fragaria ananassa</i>)	0,6 – 0,7
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	0,2 – 0,6
Casca de laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	3,5 – 5,5

2.1.2 Aplicação na indústria alimentar

Atualmente, pode-se encontrar a adição das pectinas comerciais nos mais variados tipos de alimentos. Devido à sua ação gelificante, são vulgarmente um aditivo em compotas, marmeladas, geleias e produtos de confeitaria. Também é habitualmente utilizada como estabilizante de bebidas lácteas ácidas ou iogurtes e como espessante de molhos [7]. Além da indústria alimentar, a pectina é também usada na indústria farmacêutica e na cosmética [11, 22].

A utilidade dos polissacarídeos pécticos na indústria alimentar reside no facto de estes serem uma molécula versátil. Uma vez que a sua estrutura molecular apresenta regiões polares e não polares, permite fazer parte integrante de vários tipos de sistemas alimentares. Como tal, este polissacarídeo pode ser modificado para adquirir funcionalidades específicas através de tratamentos enzimáticos ou por reações ácidas ou básicas. A escolha do tipo de polissacarídeo péctico para um determinado alimento vai depender do seu tamanho, do grau de metil-esterificação e das características do alimento, como o pH, o teor de sólidos solúveis, a textura pretendida, temperatura de processamento, presença de iões e tempo de vida útil [7].

2.1.3 Legislação

Como os polissacarídeos pécticos são constituintes das plantas, estes são parte integrante da dieta humana. Através do JECFA (*Joint Food and Agriculture Organization World Health Organization Experts Committee on Food Additives*) a pectina e a pectina amidada não apresentam nenhuma dose diária recomendada específica, pelo que são declaradas como toxicologicamente inofensivas [8]. No entanto, a pectina comercial deve ser utilizada sob condições “*quantum satis*”, ou seja, na quantidade suficientemente necessária para o fabrico do produto [23]. Por apresentar características com ação de gelificante, espessante, emulsionante e estabilizante, a pectina é usada como aditivo e apresenta, segundo o regulamento (UE) nº 1129/2011, o número E440 como aditivo alimentar [24]. Os polissacarídeos pécticos são ingeridos naturalmente através de frutos e vegetais, mas como o trato gastrointestinal humano não apresenta as enzimas específicas à sua degradação, este tipo de polissacarídeos pertence ao grupo da fibra dietética solúvel. Por apresentar propriedades fisiológicas, têm sido incorporados em produtos alimentares tornando-os em alimentos funcionais [8, 25].

2.2 Mecanismos de gelificação dos polissacarídeos pécticos

Os polissacarídeos pécticos representam um importante ingrediente alimentar, uma vez que são capazes de formar géis na presença de iões cálcio ou açúcar e ácido, dependendo das características do polímero. Do ponto de vista molecular, um gel de polissacarídeos consiste nos seguintes elementos: (a) zonas de junção onde duas ou mais cadeias estão unidas por ligações cruzadas – estas zonas podem envolver uma simples ligação covalente ou a combinação de ligações hidrogénio e interações hidrofóbicas entre duas cadeias lado a lado; (b) segmentos de inter-junção de polímeros que estão relativamente móveis tornando o gel mais flexível e; (c) água retida na rede de polímero [1, 26].

A gelificação dos polissacarídeos pécticos é dependente de vários fatores, como sua concentração, o GM, a localização dos grupos éster metílicos na cadeia, presença de iões cálcio, temperatura, pH, força iónica e presença de co-soluto [19].

A solubilidade das cadeias pécnicas e o comportamento de formação do gel são influenciados pelo GM. Dependendo deste fator, os polissacarídeos pécnicos apresentam dois tipos de mecanismos de gelificação, sendo um característico dos ácidos pécnicos (géis de cálcio) e outro das pectinas (géis ácidos) [1, 7, 27].

Outro fator essencial para a gelificação é o pH e caso este valor seja superior ao pKa, a cadeia pécnica apresenta na sua estrutura carga negativa, sendo a densidade de carga maior quanto mais elevado for o pH e mais baixo o GM. Dependendo da densidade de carga, a associação inter-cadeias de polissacarídeos pécnicos pode ser prejudicada por estas se repelirem umas com as outras [1].

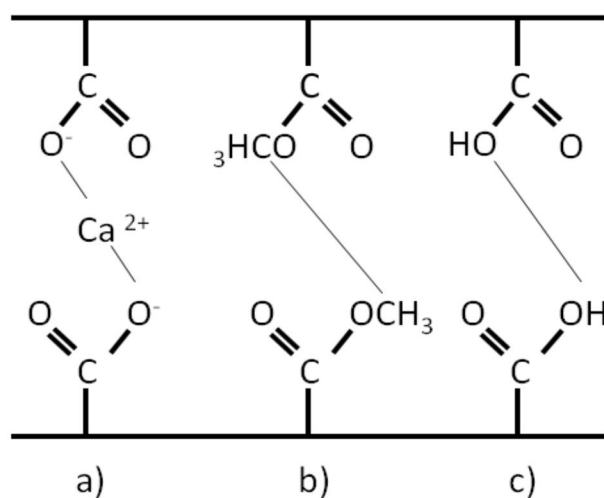


Figura 2 - Mecanismo de formação do gel a partir de polissacarídeos pécnicos – a) ligação iónica entre os grupos carboxílicos dissociados e o íão cálcio; b) interações hidrofóbicas; c) ligações de hidrogénio entre grupos carboxílicos não dissociados (Adaptado de [28]).

2.2.1 Gelificação das pectinas

O gel obtido pelas pectinas necessita da presença de elevadas concentrações de co-soluto e de um ambiente com um pH reduzido. O gel é formado por um processo complexo que envolve interações intermoleculares, sendo estabilizado por ligações cruzadas entre duas ou mais cadeias de pectinas que apresentam segmentos extensos. Assim, são formadas zonas de junção por ligações não covalentes - ligações hidrogénio e interações hidrofóbicas entre os grupos éster metílicos - tendo à volta moléculas de água (**Figura 2**). Este tipo de gel forma-se na presença de um pH inferior a 3,5, para garantir que o ambiente ácido impeça a dissociação dos grupos carboxílicos e desta forma a sua repulsão eletrostática [1, 7, 8, 29]. A presença de açúcar, normalmente a sacarose numa

concentração superior a 55% (m/m), também é necessária pela sua capacidade de diminuir a atividade da água, disponibilizando menos água para manter a cadeia de pectina em solução e, por outro lado, aumentando as interações hidrofóbicas [1, 7, 29, 30]. Este efeito hidrofóbico ocorre devido a interações não favoráveis entre as moléculas de água e os grupos éster metílicos. Estes têm tendência a coalescer associando-se de maneira a diminuir a área de contacto com a fase aquosa [1, 29]. As associações hidrofóbicas formadas durante o aquecimento, na presença de baixas concentrações (50-55%) de açúcar, causam o aumento da força do gel, enquanto elevadas concentrações diminuem a força do gel devido a uma agregação excessiva, conduzindo à formação de zonas de junção que não contribuem significativamente para a rede do gel [30]. A geometria molecular do açúcar afeta a gelificação em condições ácidas. Os açúcares que revelam uma maior interação entre os polímeros diminuem a resistência do gel, dado que é necessária uma interação polímero-polímero para a formação da rede do gel. Estudos mostraram que a frutose confere menor resistência ao gel em relação à sacarose ou glucose [1, 30, 31].

A gelificação das pectinas pode variar de acordo com o GM, sendo que este tipo de pectina comercial pode ser classificada como (a) pectina de gelificação rápida (GM > 68%) e como (b) pectina de gelificação lenta (GM ~ 60%) [2, 29]. A força do gel e a temperatura de gelificação são inversamente proporcionais ao valor do pH. Com baixos valores de pH a força do gel atinge o seu máximo, assim como a temperatura de gelificação também aumenta. Para uma concentração de açúcar a rondar os 65%, as pectinas de gelificação rápida formam géis a valores de pH entre 3,0 e 3,4 e a temperaturas relativamente altas, próximas da temperatura de ebulição. Nas pectinas de gelificação lenta irão formar-se géis num intervalo de pH compreendido entre 2,8 e 3,2 e com valores de temperatura um pouco mais baixos. As pectinas de gelificação lenta necessitam de um pH um pouco mais baixo para garantir uma força do gel igual à das pectinas de gelificação mais rápida [2, 8, 29, 32].

O tempo de gelificação encontra-se dependente da esterificação dos grupos carboxílicos. Com o aumento dos valores do GM de 50 a 70%, o tempo de gelificação vai diminuindo devido a uma maior interação entre os domínios hidrofóbicos [2, 29, 33].

Ao contrário de muitos géis formados a partir de polissacarídeos, o gel da interação entre o açúcar e a pectina não é reversível quando aplicado um tratamento térmico, isto porque as interações hidrofóbicas são perdidas ou atenuadas [20].

2.2.2 Gelificação dos ácidos pécticos

O gel formado pelos ácidos pécticos necessita da presença de iões Ca^{2+} ou outros metais iónicos divalentes, que atuam como uma ponte entre dois grupos carboxílicos dissociados de diferentes, mas próximas, cadeias de ácidos pécticos (**Figura 2**) [1, 7, 32, 34]. O mecanismo da ligação iónica entre o Ca^{2+} e os grupos carboxílicos é descrito como o modelo de “caixa-de-ovos”, originalmente descrito para o alginato, que envolve primeiramente a fase de dimerização e depois a de agregação (**Figura 3**) [35]. Neste modelo, os segmentos de inter-junção são as cadeias singulares e as zonas de junção são pares de cadeias de resíduos de ácido galacturónico, que formam dímeros com simetria helical 2_1 onde se encontram os iões cálcio [1, 7, 26, 34, 36]. O modelo é estabilizado pelas interações eletrostáticas mas também pelas ligações de hidrogénio e interações de van der Waals [1, 7, 34, 36].

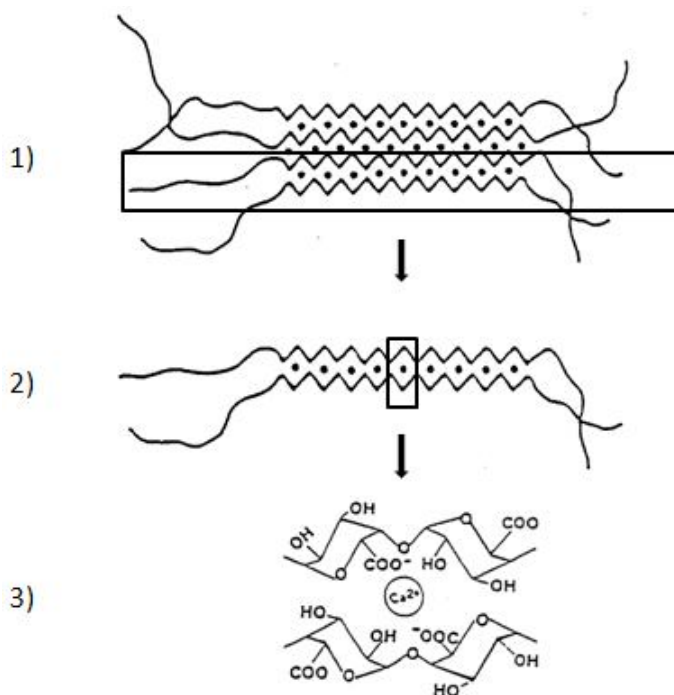


Figura 3 – Representação do modelo de “caixa-de-ovos” dos ácidos pécticos. 1) Agregado de dímeros; 2) Dímero; 3) interação eletrostática do ião cálcio com os grupos carboxílicos desesterificados (Adaptado de [1]).

As propriedades que influenciam características como a viscosidade, textura e força do gel, resultante dos ácidos pécticos, são dependentes de vários fatores. Dentro dos fatores intrínsecos, encontra-se a influência do tamanho e da distribuição do GM, tamanho da cadeia, presença de cadeias laterais ou acetilação. Além destas características da própria estrutura do polissacarídeo péctico, dos fatores extrínsecos fazem parte a dependência de iões cálcio, conteúdo de pectina, pH, adição de açúcar, presença de iões e temperatura [1, 7].

Para a formação de zonas de junção estáveis ou de alta cooperatividade é necessário um número mínimo de ácidos galacturónicos desesterificados, tendo sido estimado ser 9 [37], 6-13 [38], 14 [36] ou acima de 20 [34] através de estudos realizados a partir de diferentes técnicas indiretas. Como metade dos grupos carboxílicos estão virados para fora da “caixa-de-ovos”, a presença de alguns grupos metil-esterificados não prejudica a formação das zonas de junção [1, 7, 36].

A diminuição do grau de metil-esterificação resultará num aumento de uma sequência de resíduos de ácido galacturónico livres de grupos metílicos, aumentando a capacidade de ligação dos iões cálcio e na evolução do comportamento líquido a gel. Apesar do grau de metil-esterificação ser importante para a formação das zonas de junção, o padrão de distribuição das unidades do ácido galacturónico metil-esterificado na cadeia dos ácidos pécticos influencia as propriedades do gel [13, 27]. Quer o tamanho quer a distribuição dos grupos carboxílicos desesterificados têm um papel importante na força do gel e no número de zonas de junção com o ião cálcio. Dois padrões de distribuição dos grupos éster metílicos são conhecidos, o aleatório e o ordenado, sendo que este último promove o aumento da sua ligação ao ião cálcio, permitindo a formação de zonas de junção cooperativas, estáveis e fortes [7, 13, 32, 39].

Quando os ácidos pécticos se encontram muito despolimerizados, a redução da força do gel pode ser compensada pela adição de iões cálcio em excesso, compensando a quebra das ligações covalentes. No entanto, são necessárias pelo menos duas ligações por cadeia para a formação da rede do gel, sendo que uma forte despolimerização é incapaz de formar o gel devido à menor formação das zonas de junção entre as cadeias dos ácidos pécticos [7, 27].

Relativamente à ramificação, o excesso de cadeias laterais pode diminuir a interação entre os ácidos pécticos devido ao impedimento estérico. A ação de enzimas

desramificadoras, ao promoverem a libertação das cadeias laterais, melhora a interação entre os iões cálcio e os ácidos pécticos [1, 7].

A presença de grupos acetilo diminui a gelificação por impossibilitarem a ligação dos iões cálcio com os grupos carboxílicos dissociados. A utilização de um tratamento enzimático com a acetil esterase provoca a remoção dos grupos acetilo. Esta ação permite que a PME aumente o GM, ocorrendo a formação de zonas de junção na presença de iões cálcio, capazes de formar a estrutura do gel [1, 7].

Quanto à influência da concentração de cálcio na gelificação, esta é descrita estereoquimicamente pelo rácio (R) da concentração de cálcio com a quantidade de grupos carboxílicos livres na cadeia dos ácidos pécticos [40-43].

$$R = 2[Ca^{2+}]/[COO^-]$$

O aumento do rácio melhora a força do gel porque mais zonas de junção serão formadas. Acima de um certo valor de R poderá ocorrer separação de fases. Neste caso, se a concentração de polissacarídeos pécticos for elevada ocorrerá sinerese. Por outro lado, se a concentração de polissacarídeos pécticos for baixa, estes irão precipitar [40, 42, 44]. Se o R se mantiver constante, os ácidos pécticos em concentrações elevadas aumentam a força do gel devido à formação das ligações entre as cadeias. Com baixo teor de ácidos pécticos ocorrerá a formação de ligações intra-cadeia que não contribuem para a formação da rede do gel [40-43].

Abaixo do valor de 4,5, o pH influencia a gelificação dos ácidos pécticos. Acima deste valor a associação dos iões cálcio com os grupos carboxílicos dissociados ocorre para a formação das zonas de junção. Quando o valor do pH for muito inferior ao pKa da cadeia dos ácidos pécticos ($\approx 3,2$) a afinidade dos iões cálcio será menor, formando-se ligações de hidrogénio entre as cadeias devido à protonação dos grupos carboxílicos [1, 40, 41, 45]. A adição de açúcares não é necessária para a formação do gel mas, ao diminuir a atividade da água, pode aumentar a força do gel por favorecer a interação entre as cadeias. Uma melhoria na qualidade do gel irá depender da quantidade e do tipo de açúcar adicionado [44, 46]. A presença de iões monovalentes, como o NaCl, diminui a repulsão das interações eletrostáticas entre as cadeias dos ácidos pécticos. Consequentemente, esta consegue gelificar na presença de reduzidas quantidades de iões cálcio em relação à

ausência do sal. Pelo contrário, alguns ácidos orgânicos, como o ácido tartárico e ácido ascórbico, têm a capacidade de quelatar os íons cálcio e diminuir a formação do gel [7].

A temperatura de transição sol-gel depende da estrutura dos ácidos pécticos. Com a diminuição da temperatura ocorre uma maior interação das ligações de hidrogénio e estabilização das ligações com o íon cálcio. A temperaturas elevadas, os géis de ácidos pécticos quebram, mas com o arrefecimento são capazes de voltar a formar-se, em resultado da sua capacidade termo-reversível [40-42, 47].

No caso do ácido péctico se encontrar amidado, a sua gelificação apresenta vantagem em relação ao ácido péctico sem grupos amida, isto porque necessita de uma menor concentração de cálcio para garantir uma boa gelificação. A presença dos grupos amida nas cadeias de ácido péctico permitem a formação de géis fortes mesmo a pH baixo, uma vez que ocorre a formação de pontes de hidrogénio entre os grupos amida [20, 41].

2.3 Mecanismos de reações enzimáticas e não enzimáticas

Os produtos alimentares derivados de frutas apresentam propriedades de textura, como consistência de fluidos, firmeza de partículas alimentares e formação de géis e agregados. Estas propriedades devem-se à presença dos polissacarídeos pécticos [48]. No entanto, estes polissacarídeos podem sofrer alterações na sua estrutura através de vários mecanismos. Eles podem ser degradados quando estão inseridos nas paredes celulares das plantas tanto pelas enzimas endógenas como pelas enzimas exógenas, pelo que também podem sofrer reações não enzimáticas após a colheita e durante o processamento [16, 48]. Desta forma, é possível partir destas transformações e modificar as propriedades funcionais dos polissacarídeos pécticos para diversas finalidades. Com este conhecimento consegue-se identificar quais os mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (**Figura 4**) capazes de modificar a estrutura dos polissacarídeos pécticos. Os fatores que regulam estas reações e as características dos produtos após a sua manipulação desencadeiam novas oportunidades para a aplicação na indústria [16].

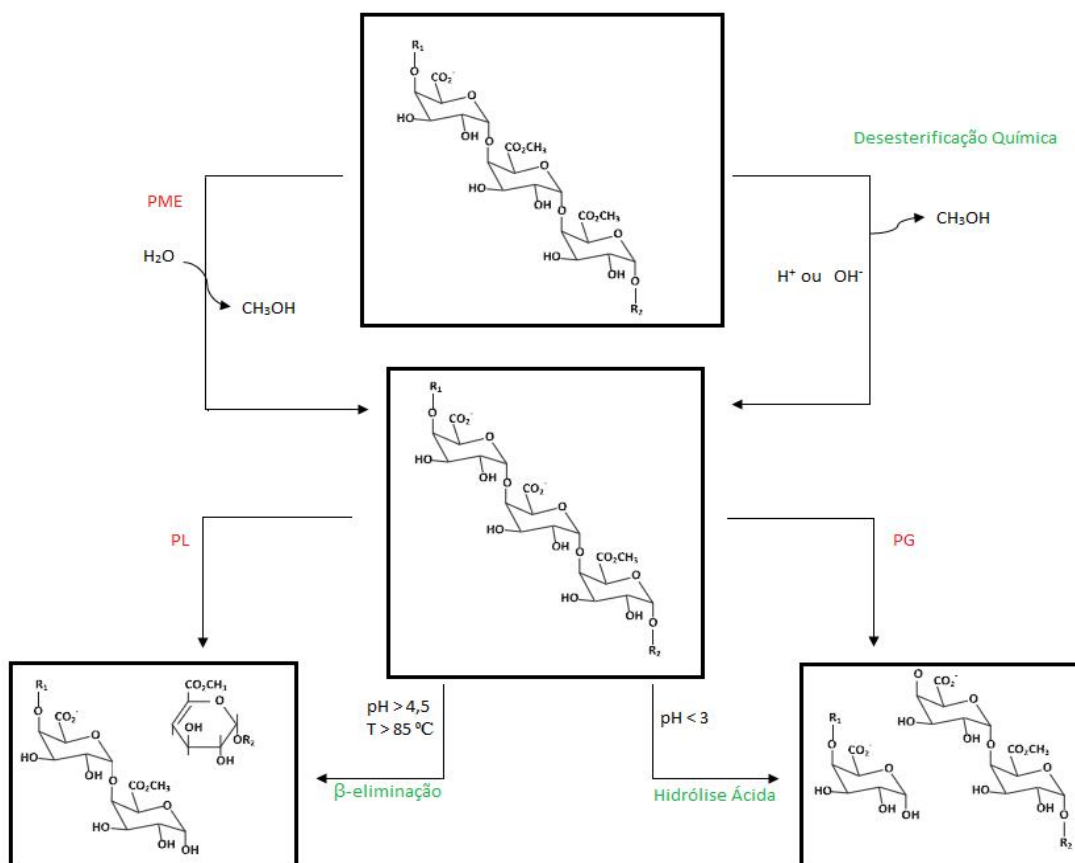


Figura 4 - Possíveis reações de modificação nas cadeias de polissacarídeos pectícos. Reações enzimáticas (vermelho) e reações não enzimáticas (verde) (Adaptado de [49]).

2.3.1 Mecanismos de reações enzimáticas

As enzimas que degradam os polissacarídeos pectícos são chamadas de pectinases, e a sua classificação está relacionada com o tipo de mecanismo de degradação- trans-eliminação ou hidrólise, clivagem aleatória ou sequencial e tipo de substrato (pectina ou ácido pectico) [50]. Existem grupos distintos de pectinases, as que catalisam as reações de desesterificação (esterases) e as de despolimerização (hidrólases e liases) [4, 51]. Estas enzimas podem ser produzidas por fungos, leveduras, bactérias e plantas, sendo as de origem fúngica globalmente usadas no processamento de fruta [6, 17]. A produção de pectinases por filamentos fúngicos varia de acordo com a estirpe, a composição do meio de crescimento e condições de cultivo (aeração, pH, temperatura, agitação e tempo de incubação) [17]. Atualmente, este tipo de enzimas é bastante importante na tecnologia

alimentar para a maceração de frutos e vegetais, tal como para a extração, concentração e clarificação dos sumos [17].

2.3.1.1 Desesterificação

A pectina metil-esterase (PME), também chamada de pectinesterase (EC 3.1.1.11), participa na desesterificação do grupo metílico da pectina formando ácido péctico e metanol [4, 51, 52]. O modo de ação da enzima depende da sua origem. As de origem fúngica atuam de uma forma preferencialmente aleatória e as extraídas das plantas atuam a partir dos grupos éster metílicos dos resíduos galacturónicos próximos das unidades galacturónicas não esterificadas, ou através do terminal não redutor [6, 53]. As condições ótimas de pH em que a PME atua situam-se entre 4 e 8, e as temperaturas variam de 40 a 50°C [6, 54]. Esta enzima atua como o primeiro passo da clivagem da pectina para, posteriormente, a poligalacturonase e a pectato liase atuarem num substrato péctico desesterificado [4, 51]. A ação da enzima tem a capacidade de alterar a viscosidade da pectina. Assim, quando iões cálcio estão presentes, a viscosidade aumenta devido à formação das zonas de junção entre as cadeias pécticas [6]. Na indústria alimentar, a PME é utilizada para melhorar a textura e a firmeza de frutos e vegetais, assim como na extração e clarificação de sumos de frutas [6, 54].

2.3.1.2 Despolimerização

A poligalacturonase (PG) participa na hidrólise das ligações glicosídicas α -(1→4) que ligam os ácidos poligalacturónicos, libertando os ácidos galacturónicos. Esta enzima degrada preferencialmente o pectato e existe em dois tipos de acordo com a sua forma de clivagem: forma endógena (EC 3.2.1.15), catalisando o substrato aleatoriamente, e forma exógena (EC 3.2.1.67) catalisando o substrato sequencialmente a partir da extremidade não redutora, libertando o ácido galacturónico ou, em alguns casos, dissacarídeos de ácido galacturónico [4, 51]. A endopoligalacturonase é produzida por vários organismos, como fungos, bactérias, algumas leveduras ou plantas superiores. Por sua vez, a exopoligalacturonase encontra-se em fungos, bactérias e frutas ou vegetais. O seu modo de ação varia de acordo com a sua origem, sendo o pH ótimo entre 3,5 a 5,5 e a temperatura ótima de 30 a 50°C [6, 54].

Apesar de alguns artigos referirem a sua atividade catalítica [55, 56], a existência da polimetilgalacturonase (PMG) ainda é questionada por alguns autores [5, 6, 54]. A PMG atua preferencialmente na pectina e desta forma também é chamada de pectina hidrolase. Esta enzima hidrolisa as ligações glicosídicas α -(1→4), pelo que tanto pode ter atividade endógena, clivando de uma forma aleatória as ligações de pectina com elevada esterificação, como atividade exógena, clivando de uma forma sequencial a partir do terminal não redutor da cadeia de pectina [4, 51]. Esta enzima pode estar presente em alguns fungos [54, 56].

A pectato liase (PL) cliva as ligações glicosídicas α -(1→4) através de uma reação de trans-eliminação entre os resíduos de ácido galacturónico que não apresentam metil-esterificação (pectato). Como resultado, ocorre a formação de uma ligação insaturada entre o C4 e C5 do terminal não redutor da cadeia de resíduos de ácido galacturónico - (Δ -4,5-D-galacturonato). A enzima atua a um pH ótimo próximo de 8,5 e a uma temperatura entre 40 e 50°C [54, 57]. Esta reação requer a presença de iões cálcio e é inibida pela presença de agentes quelantes como o EDTA. O papel do ião cálcio na atividade da enzima ainda não está esclarecido, mas propõe-se que este seja o sítio ativo da enzima [4, 6, 51, 57]. A PL existe na forma endógena (EC 4.2.2.2), atuando de forma aleatória, e na forma exógena (EC 4.2.2.9), catalisando o substrato através do terminal não redutor [4, 6, 51]. Esta enzima encontra-se presente maioritariamente nos fungos [6, 51].

A polimetilgalacturonato liase (PMGL), conhecida como pectina liase, catalisa a clivagem da pectina, produzindo ácidos metiloligogalacturónicos insaturados - (Δ -4,5-D-galacturonato) através de trans-eliminação de ligações glicosídicas. A enzima de origem fúngica apresenta a sua atividade ótima num meio ácido e neutro, atuando preferencialmente a um pH ótimo próximo de 5,5, enquanto as procedentes das bactérias têm mais atividade no meio alcalino [51, 54]. Independentemente da sua origem, a enzima atua a uma temperatura ótima entre 40 e 60°C [54, 57]. Este tipo de enzima não requer a ativação pela presença do ião cálcio mas é estimulada por este ou outros catiões. Esta enzima pode ser endógena (EC 4.2.2.10), clivando de forma aleatória a ligação glicosídica α -(1→4) de pectinas com os grupos carboxílicos metil-esterificados, ou exógena, clivando de forma sequencial [51, 54].

A ação combinada de várias enzimas degradativas nos polissacarídeos pécticos altera as propriedades texturais dos frutos e vegetais. Durante o amadurecimento destes, ocorrem reações de desesterificação pela PME, permitindo melhorar a textura dos frutos com os iões cálcio presentes endogenamente. A despolimerização pela PG fica favorecida pela diminuição do GM e converte os ácidos pécticos em polissacarídeos pécticos de baixo peso molecular, levando ao aumento da sua solubilidade. A nível celular ocorre perda da adesão entre células e diminuição da firmeza do tecido [20, 58-61]. A ação das glicosidases é também responsável pela perda de açúcares neutros, como a galactose e arabinose, diminuindo a ramificação destas moléculas durante o amadurecimento [20, 61, 62]. Para além dos mecanismos enzimáticos, algumas reações não enzimáticas são também responsáveis pela alteração dos polissacarídeos pécticos dos frutos e vegetais, tais como a β -eliminação, levando à perda da estrutura da parede celular [20, 60, 61].

Apesar destes mecanismos ocorrerem durante a maturação da globalidade dos frutos, o efeito na alteração da rigidez varia de espécie para espécie. Além disto, o grau de maturação influencia as propriedades do tipo de polissacarídeo extraído comercialmente [20, 60].

2.3.1.3 Aplicações das enzimas na indústria alimentar

Com base na sua aplicação na indústria alimentar, as pectinases são divididas em ácidas e alcalinas.

As pectinases ácidas têm como origem principal os fungos, sendo muito utilizadas na indústria de sumos de frutas e vinhos, com o objetivo de extrair, clarificar e remover as pectinas dos sumos de fruta e participarem na maceração de vegetais para a produção de pastas e purés [5, 51]. No caso dos sumos de frutas, as pectinas são responsáveis pela consistência, turbidez e aumento da viscosidade para impedir o processo de filtração [5]. Com a adição das pectinases na fase de extração obtém-se uma melhoria do rendimento do processo, uma diminuição da viscosidade do sumo, uma menor turbidez (clarificação) e a quebra da estrutura do gel que é formada, libertando o sumo que fica ligado à polpa [5, 6, 51]. Na indústria dos vinhos, a adição de pectinases melhora algumas características como a cor e a clarificação, em comparação com os vinhos não tratados. Neste caso, as enzimas são adicionadas na maceração da fruta e antes da aplicação da levedura [63].

As pectinases alcalinas têm como principal origem a bacteriana e são utilizadas para o tratamento das águas residuais que contêm resíduos de polissacarídeos pécnicos do processamento de vegetais, fermentação de chá e café, extração de óleo vegetal, tratamento da pasta de papel, entre outros. As pectinases destroem os polissacarídeos pécnicos inibindo a formação de espuma dos pós de chá instantâneo e aceleram a fermentação do chá. No café, as enzimas removem as mucilagens dos grãos de café [4, 6, 51]. Na extração de óleo vegetal, as pectinases são adicionadas com o objetivo de degradar a parede celular num processo aquoso, o que provoca a liquefação dos constituintes das paredes celulares das sementes que contêm o óleo, com o objetivo de no final obter o óleo vegetal [4, 54].

2.3.2 Mecanismos de reações não enzimáticas

Os processos de tratamento térmico (pasteurização) podem conduzir a uma degradação e perda da funcionalidade dos polissacarídeos pécnicos por mecanismos não enzimáticos [48].

Uma despolimerização pode ocorrer por β -eliminação química ou por hidrólise ácida, sendo que estas duas reações causam uma redução significativa na viscosidade do gel e peso molecular dos polissacarídeos pécnicos [1, 22, 64]. A hidrólise ácida das ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4) de ácidos pécnicos ocorre preferencialmente a temperaturas acima de 100°C e em meio ácido (pH < 3) (**Figura 5**) [1, 16, 22, 65]. Uma hidrólise ácida do ácido pécnico a pH 6 ocorre de forma lenta, sendo que a diminuição do pH aumenta a velocidade da reação. Durante os tratamentos térmicos em condições ácidas, uma desesterificação também pode ocorrer, melhorando a sensibilidade à hidrólise ácida [66]. A pH 4,5, a pectina cítrica é mais estável do que o pectato cítrico, sendo que a degradação deste diminui com o aumento do GM [48].

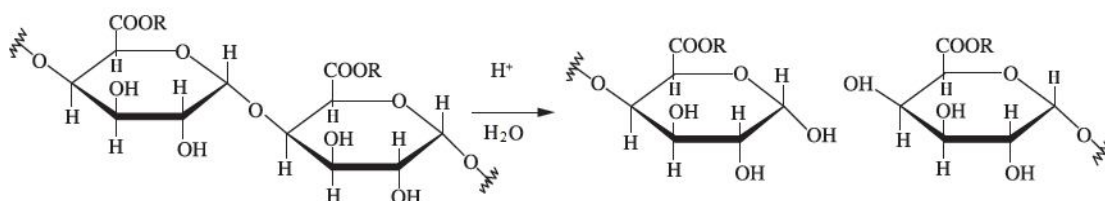


Figura 5 - Representação da reação de hidrólise ácida nos polissacarídeos pécnicos (Adaptado de [22]).

A reação de β -eliminação é potenciada pelo aumento da temperatura, do pH e do GM (**Figura 6**). Esta reação de trans-eliminação, que apenas ocorre em ligações glicosídicas adjacentes a um grupo carboxílico metil-esterificado, resulta da remoção do átomo de H do C₅ pelo ião hidroxilo, que se encontra mais ácido devido à presença do grupo éster metílico. Assim, surge a formação de um anião intermediário que vai ser estabilizado pela perda da ligação C-O na posição β [1, 16, 22, 48, 62, 64]. Como resultado, ocorre a quebra da ligação glicosídica e a formação da ligação dupla entre C₄ e C₅ no terminal não redutor, permitindo a formação de um composto insaturado que absorve a 235 nm. Como a reação depende da temperatura, a sua inibição é possível pela presença temperaturas inferiores a 10°C [22, 48, 62, 64]. O efeito do GM influencia a degradação dos polissacarídeos pécticos, sendo que o pectato é mais estável que a pectina a elevadas temperaturas e a pH neutro ou alcalino. O pectato, por não conter o grupo metil-esterificado no C₆ do ácido galacturónico, torna o H em C₅ menos ácido, além de repelir o ião hidróxido (OH⁻) com a carga negativa dos grupos carboxílicos [1, 16]. A pH de 4,5, um estudo revelou que a reação de β -eliminação era favorecida com o aumento da temperatura de aquecimento, tendo uma energia de ativação de 136 kJ/mol. Este valor de energia era semelhante para níveis de pH entre 7 e 11, sugerindo-se que, para esta gama de valores de pH, a reação de β -eliminação é mais dependente da temperatura que do pH [48].

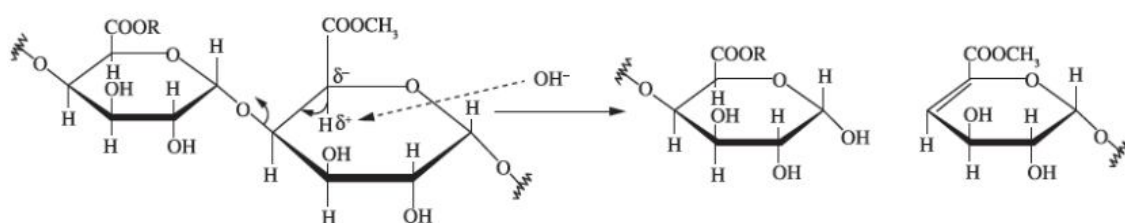


Figura 6 – Representação da reação de β -eliminação nos polissacarídeos pécticos (Adaptado de [22]).

Quando o pH está compreendido entre 3,5 e 4,0, a β -eliminação torna-se o principal mecanismo de degradação das pectinas relativamente à hidrólise ácida, podendo um baixo GM alterar este efeito [65].

A desesterificação pode ocorrer por meio ácido ou básico, sendo catalisada pela presença de grupos H⁺ e OH⁻, respetivamente (**Figura 7**), ocorrendo a libertação do grupo metílico [1, 22, 66]. Em meio ácido, a reação ocorre com um pH compreendido entre 1 a 3

e a temperaturas inferiores a 10°C [1, 22], enquanto a pH alcalino a pectina é rapidamente desesterificada mesmo à temperatura ambiente [11]. A velocidade de desesterificação é favorecida com o aumento do pH entre 8 e 11 [48].

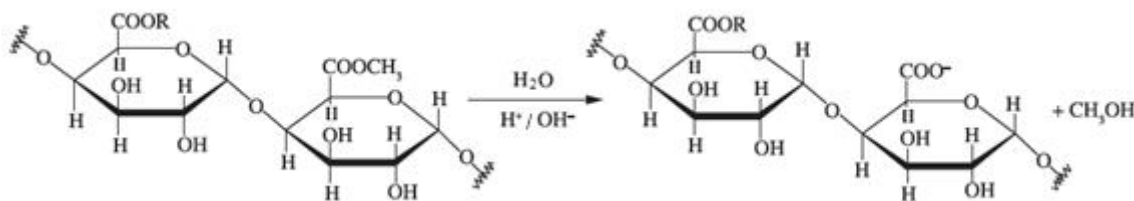


Figura 7 - Representação da desesterificação química nos polissacarídeos pécticos (Adaptado de [22]).

Apesar do GM da pectina favorecer a degradação por β -eliminação, esta reação nunca chega completa devido a uma desesterificação química competitiva [62, 66, 67]. De modo a melhorar a extensão da degradação química é necessário controlar a temperatura e o pH [62, 67]. Termodinamicamente, o aumento da temperatura desencadeia a reação de β -eliminação em relação à desesterificação, enquanto os valores de pH elevados favorecem a desesterificação [62, 66, 67]. Deste modo, para uma reação de β -eliminação mais seletiva é necessário uma temperatura de 115°C e pH inferior a 5, sendo que a desesterificação é altamente favorecida a pH superior a 11 e temperatura inferior a 12°C [62, 67]. Com o objetivo de melhorar ou preservar a textura dos frutos ou vegetais, uma desesterificação é preferível a uma despolimerização por β -eliminação. Através de uma desesterificação controlada obtém-se uma pectina com GM mais baixo e menos suscetível à β -eliminação. Esta pectina sujeita à desesterificação pode ligar-se a iões divalentes por ligações cruzadas, formando redes que proporcionam mais firmeza aos frutos [64].

2.4 Aplicações dos polissacarídeos pécticos na indústria alimentar

Os polissacarídeos pécticos quando aplicados como aditivo conferem diferentes características ao alimento, alterando as suas propriedades de viscosidade e de textura. A ação destes é dependente das condições do sistema em que é adicionada, como o pH, quantidade e tipo de açúcar, força iónica, tipo de fruta, etc [32]. Em seguida, serão apresentados algumas matrizes onde ocorre a aplicação dos polissacarídeos pécticos.

2.4.1 Bebidas à base de fruta

Para melhorar o sabor e a viscosidade de sumos é frequentemente usada a pectina [2]. As bebidas contêm componentes insolúveis, como polpas, *clouds* ou óleos essenciais que têm tendência à sedimentação. Com o objetivo de manter os componentes insolúveis em suspensão, a pectina tem sido adicionada às bebidas à base de frutos (**Figura 8**). Por exemplo, há uma patente que divulga que o uso de uma pectina com baixo teor de metil-esterificação na presença de iões cálcio tem a capacidade de suspender partículas em soluções aquosas. Além disso, mostra pseudoplasticidade, evita a separação de fases e melhora o sabor. Esta pectina com baixo teor de metil-esterificação foi preparada através de uma pectina não sensível a cálcio [18].



Figura 8- Observação da suspensão de partículas no sumo de laranja com (imagem à esquerda) e sem a adição de pectina (imagem à direita). A pectina mostra capacidade de impedir a sedimentação da polpa do fruto [68]

2.4.2 Bebidas lácticas ácidas

A adição de um estabilizante para evitar a separação que ocorre devido à floculação das proteínas do leite torna-se necessária nas bebidas lácticas ácidas [69]. Nestas bebidas e a um pH ~ 4 , a pectina é utilizada após a fermentação como um colóide para as caseínas. O estabilizador pode atuar através do aumento da repulsão entre as micelas das caseínas, prevenindo a floculação, ou a partir da imposição de uma barreira cinética contra a agregação das proteínas de uma forma extensiva. A pH 6,7, as cadeias das κ -caseínas encontram-se à superfície das micelas, provocando a sua suspensão e uma repulsão mútua devido à sobreposição das cadeias gerada pela perda de entropia [69]. Na acidificação do leite para pH 4 a repulsão entre micelas não ocorre. Consequentemente, têm propensão

para se agregar, sendo necessária a adição de uma pectina [8, 69]. A pectina adicionada é de alta metil-esterificação, apresentando a pH 4 alguma distribuição de cargas sequencial ao longo da cadeia. O mecanismo de estabilização pela pectina ocorre pela adsorção à superfície da micela através das zonas da cadeia com carga negativa, enquanto as zonas sem carga formam *loops* na superfície capazes de repelir as micelas umas das outras (**Figura 9**). Desta forma, as proteínas não se agregam umas às outras, mesmo durante o tratamento térmico [32].



Figura 9 - Esquema da ação da pectina na estabilização das κ -caseínas com a diminuição do pH. Ocorre uma adsorção das pectinas à superfície das micelas evitando a sua agregação (Adaptado de [69]).

2.4.3 Geleias e compotas

A pectina presente nos frutos é a principal responsável pela formação do gel em geleias ou compotas, fornecendo as suas características reológicas, como uma textura estável, firme e capacidade de ser servida à colher. A pectina endógena dos frutos e vegetais geralmente apresenta um elevado GM, necessitando de grandes quantidades de açúcar (63-70%) para obter a viscosidade desejável. Durante o tratamento térmico destes produtos, as enzimas presentes na fruta são inativadas e a pectina endógena é extraída. A durabilidade do produto é proporcionada pela sua própria acidez e pela baixa atividade de água [8, 70]. O conteúdo de pectina nos frutos depende do tipo e do estado de maturação da fruta, sendo adicionada a pectina comercial para garantir a consistência na viscosidade final [8]. O tipo de pectina a ser utilizado vai depender do produto final e do processo de fabrico. A geleia feita tradicionalmente (panela aberta) utiliza uma pectina de gelificação

rápida, mas como industrialmente esta é feita a vácuo, não necessita de temperaturas tão elevadas, requerendo apenas uma pectina de gelificação lenta para evitar a pré-gelificação [8, 32].



Figura 10 - Exemplos de compotas e geleias nas quais a pectina tem um papel fundamental.

No contexto de que a população se preocupa com o valor calórico dos alimentos, uma patente divulgou a adição de PME no tratamento de frutos e vegetais com o objetivo de obter pectinas de baixo teor de metil-esterificação, a partir das pectinas endógenas de alto teor de metil-esterificação. Como os polissacarídeos pécticos obtidos são dependentes de iões cálcio para gelificar e não necessitam da presença de açúcar, é possível obter geleias ou compotas com pouca e mesmo nenhuma adição de açúcar [70]. Estas, por sua vez, não podem ser feitas com pectinas de alto teor de metil-esterificação porque requerem elevadas concentrações de co-solutos, sendo necessário o uso de ácidos pécticos para ocorrer a gelificação [32]. Para garantir a durabilidade, sem a adição de conservantes, estes produtos têm de sofrer um tratamento térmico, assegurando a eliminação de microrganismos [8, 32].

2.4.4 Preparados de Fruta

O uso das pectinas nos preparados de fruta tem uma aplicação diversificada e finalidades diferentes, pois esta é usada em produtos lácteos, pastelaria e confeitaria.

2.4.4.1 Preparados de fruta para aplicação a produtos lácticos

A indústria de iogurtes de fruta e sobremesas lácticas tem vindo a aumentar, sendo necessária a formulação de preparados com fruta de boa qualidade para garantir o nível de exigência. Atualmente, tem havido uma tendência na substituição de alguns hidrocolóides pela pectina como espessante, dado que fornece uma melhor textura e gosto ao produto final. Os preparados de fruta para iogurte após a pasteurização são deixados arrefecer e por volta dos 40-50°C são posteriormente depositados em contentores e fechados asseticamente. Nesta etapa, é preciso que o preparado apresente uma viscosidade que garanta a suspensão dos pedaços de fruta e que seja facilmente miscível. Logo que o preparado atinja a temperatura ambiente, a sua textura deve ser macia e ter fluidez suficiente para ser bombeado. O pH final dos preparados deve ser entre 3,5 e 4,0, próximo do pH natural do iogurte. O tipo de polissacarídeos pécticos usados tem sido os ácidos pécticos (amidados) por apresentarem uma velocidade de gelificação mais rápida [32].

O conteúdo de fruta e o teor de sólidos solúveis variam de preparado para preparado, tornando-se difícil seguir uma receita. Esta apenas serve de guia, uma vez que as propriedades de fluxo podem ser ajustadas para uma variedade de produtos. Caso a base do preparado seja líquida, é possível mudar a viscosidade com a adição de cloreto de cálcio após a pasteurização ou usar um polissacarídeo péctico de rápida gelificação para uma textura desejada [32].

As pectinas de alto teor de metil-esterificação atuam a pH baixo como estabilizadores da dispersão de proteínas em bebidas de iogurte, bebidas lácteas/sumo de fruta, bebidas do soro do leite e de soja acidificadas. Os ácidos pécticos podem atuar para a formação de géis neutros de sobremesas lácticas ou, como espessantes, a pH um pouco mais ácidos pela interação com o cálcio e proteínas do leite [32].

2.4.4.2 Preparados de fruta para aplicação em pastelaria

A propriedade principal da preparação de geleias para aplicação na pastelaria é a sua estabilidade a elevadas temperaturas (150-180°C), para a sua utilização ser adequada em tortas ou tartes recheadas [8, 32]. Quando se utiliza uma pectina de elevado teor de metil-esterificação no preparado de fruta, o gel formado é caracterizado por uma excelente facilidade de barrar, mas acarreta uma desvantagem que é a sua destruição quando sujeito a

um elevado *stress* mecânico. Quando isto acontece, a estrutura do gel é quebrada e ocorre a saída da água, provocando sinerese no preparado de fruta. A água libertada irá depois evaporar no processo de cozedura. Por este motivo, o preparado do gel formado pela pectina de alto teor de metil-esterificação é apenas utilizado tradicionalmente, onde existe baixo *stress* mecânico, sendo que a nível industrial é usada uma pectina de baixo teor de metil-esterificação por apresentar melhores resultados. A interação dos iões cálcio com a pectina de baixo-teor de metil-esterificação possibilita a obtenção de um gel com textura estável e fácil de manusear [32].

2.4.4.3 Preparados de fruta para aplicação em confeitaria

A pectina utilizada na formação de geleias para confeitaria pode ser de dois tipos, dependendo do produto final: caso o produto tenha uma textura suave e macia, é usada a pectina de alto teor de metil-esterificação, no caso do produto com uma estrutura mais elástica, são usadas as de baixa metil-esterificação ou pectinas amidadas na presença de tampões fosfato sequestrantes [8, 32].

As geleias para confeitaria são normalmente produzidas com elevado teor de sólidos solúveis (78%) e na presença de pectina de alta metil-esterificação, mas nesta circunstância torna-se necessário valores de pH um pouco elevados para evitar uma pré-gelatinização, adquirindo tempos longos de deposição. Desta forma, é essencial usar uma pectina que gelifique a baixas temperaturas e que apresente baixa viscosidade durante o tratamento térmico ou que possua um retardador da gelificação. Neste último caso, são aplicados os sais de tampão, para assim serem usados pH mais baixos, evitando uma pré-gelatinização [8, 32]. O tipo e a quantidade de sais tampão a serem usados pode variar dando uma perceção de acidez ao produto final [8].

Geleias com sabores neutros podem ser confeccionadas com pectinas de baixo teor de metil-esterificação em conjugação com os sais de tampão fosfato, controlando a disponibilidade dos iões cálcio necessários para a formação do gel [8].

3. Contextualização do tema com o trabalho a realizar

Atendendo às diferentes propriedades dos polissacarídeos pécticos, este trabalho de estágio pretende funcionalizar tecnologicamente as pectinas presentes nas polpas das frutas. Serão aplicadas técnicas enzimáticas ou reações não enzimáticas de forma a modificar a estrutura dos polissacarídeos pécticos, melhorando a textura e consistência das polpas de frutos. Através da valorização das polpas de frutos pretende-se desenvolver preparados de fruta com pedaços sem recurso a aditivos com funções de espessantes e estabilizantes, reduzindo-se assim o número de ingredientes e dando naturalidade ao preparado. Os preparados de fruta têm como aplicação final o iogurte batido e pretende-se que apresentem uma boa análise sensorial ao nível da aparência, do sabor e da textura.

Industrialmente, o preparado de fruta sem aditivos, mas com o conservante sorbato de potássio, não deve apresentar sinerese durante um tempo máximo de 90 dias. Também deve evidenciar uma viscosidade suficiente para suspender os pedaços de fruta adicionados, podendo assim ser utilizado em grande escala.

3.1 Análise de Mercado

No desenvolvimento de um novo produto alimentar é importante fazer uma análise de mercado de forma a obter informações e identificar oportunidades que uma empresa possa aproveitar. É necessário avaliar as novas tendências, conhecendo o ritmo das novidades e das mudanças, permitindo a adaptação às novas exigências. Segundo um estudo de mercado (**Figura 11**), realizada desde janeiro a setembro de 2012 pelo grupo *Mintel*, os produtos que indicam não possuírem aditivos/conservantes encontram-se como os mais indicativos de saudável [71]. Além disto, num estudo realizado no Reino Unido, 36% dos consumidores consideraram o *claim* “sem aditivos” o mais importante num produto alimentar [72].

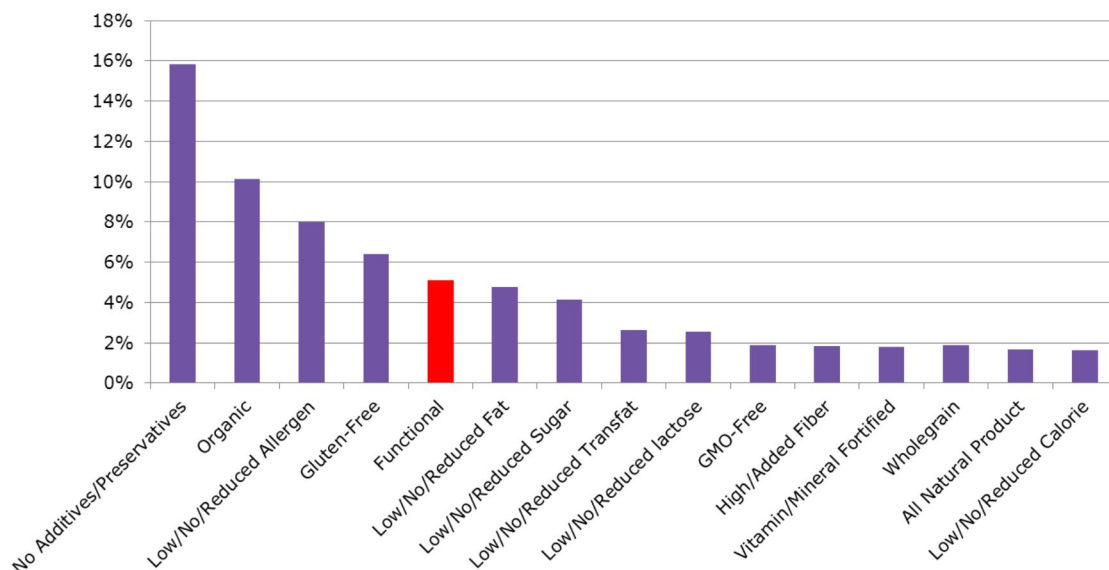


Figura 11 - Top 15 dos conceitos que transmitem aos alimentos e bebidas não alcoólicas a ideia de saudável. Estudo realizado na Europa, pelo grupo *Mintel*, de janeiro a setembro de 2012 [71].

O conceito de um produto natural tem provocado alguma controvérsia. A sua definição é ainda complexa, visto que apenas 33% dos consumidores norte-americanos sente que pode confiar no termo “natural” quando presente num produto. O conceito de naturalidade transmite uma imagem de saúde e bem-estar ao consumidor e, além disto, pode significar alguma simplicidade na formulação do produto, originando uma rotulagem mais limpa (*clean label*) que permite uma comunicação simples e direta para o consumidor. Um dos *claims* mais vulgar num rótulo limpo é a ausência de aditivos ou conservantes. Contudo, a existência de alguns aditivos naturais pode ou não ainda ser aceite. Pela definição da *National Starch* o conceito de *clean label* consiste na ausência de aditivos químicos, numa lista de ingredientes simples (sem ingredientes químicos ou artificiais) e na utilização mínima de técnicas de processamento [72].

Além desta última análise de tendência, é necessário visualizar a concorrência existente no mercado, investigando produtos similares que apresentem o mesmo posicionamento no mercado, ou seja, concorrentes diretos. Para a análise de concorrência foram comparados iogurtes com o conceito de natural, *clean label* e ausência de aditivos, uma vez que o produto aqui desenvolvido pretende atingir estas características. Foram identificados diversos tipos de iogurtes que por uma característica ou outra se assemelham ao aqui desenvolvido, mas nenhum encontrado satisfaz por completo as condições

pretendidas. Na **Tabela 2** estão representadas as características de 6 iogurtes concorrentes, mas nenhum apresenta pedaços de fruta na sua constituição, sendo o produto aqui desenvolvido diferenciador e com uma maior possibilidade de entrada no mercado [73]. O iogurte Mundella apresenta-se como um produto com ausência de aditivos na sua constituição, no entanto, vai contra a tendência de *clean label* dado que contém uma elevada quantidade de ingredientes. O iogurte Nöm Mix contém apenas 7 ingredientes, considerando que estes são 100% naturais, mas poderá haver alguma controvérsia quando incluído no posicionamento de “sem aditivos”, isto porque são adicionadas pectinas na sua formulação. O produto Noosa é considerado um alimento 100% natural, contém poucos ingredientes e nenhum é considerado como aditivo. Contudo, este produto alimentar apresenta-se como um iogurte líquido e o preparado à base de fruta aqui desenvolvido pretende-se que seja inserido num iogurte batido. O Danone Activia Pur foi o iogurte encontrado no mercado que apresenta o menor número de ingredientes, sendo constituído apenas por iogurte, fruta e açúcar. Este produto, apesar de não conter pedaços de fruta, apresenta-se como um dos fortes concorrentes ao aqui desenvolvido. No entanto, a presença de uma embalagem bicompartimentada com o preparado à base de fruta garante uma maior estabilidade ao preparado, uma vez que não está em contacto direto com o iogurte. O Yoplait Simply 6 apresenta a tendência de *clean label*, contendo apenas 6 ingredientes simples, naturais e de fácil compreensão ao consumidor. O Arla e o Dannon Pure apresentam-se como iogurtes 100% naturais, sem a adição de aditivos e com um baixo número de ingredientes. O Danone DanVia apresenta-se como um iogurte sem a adição de aditivos, contudo, a presença de adoçantes como o eritritol pode causar alguma discórdia deste seu posicionamento quanto à naturalidade.

Tabela 2 – Apresentação de alguns produtos com o mesmo posicionamento de mercado ao desenvolvido [73].

Produto								
Empresa	Mundella Foods	Nöm	Dairy Brands	Danone	Yoplait	Arla	Dannon	Danone
Marca	Mundella	Nöm Mix	Noosa	Danone Activia Pur	Yoplait Simply 6	Arla	Dannon Pure	Danone DanVia
País	Austrália	Áustria	Austrália	Alemanha	EUA	Holanda	EUA	Alemanha
Data de Publicação	janeiro de 2013	novembro 2012	dezembro 2012	agosto de 2012	julho de 2012	julho de 2011	fevereiro de 2012	novembro de 2012
Descrição do produto	<p>Iogurte não contém gluten, conservantes artificiais ou aditivos (Gordura de leite, natas, puré de manga e banana, açúcar branco, água, amido de arroz, concentrado de sumo de limão, aroma natural...)</p>	<p>Iogurte 100% natural e livre de aditivos artificiais (iogurte, açúcar branco, puré maçã, puré de marmelo, pectinas, concentrado de sumo de limão e canela)</p>	<p>Iogurte 100% natural e sem 99% de gordura de iogurte (Leite, sólidos de leite, puré de morango, açúcar branco, água e culturas)</p>	<p>Contém apenas 3 ingredientes: iogurte, fruta e cana de açúcar, livre de aditivos, corantes e aromas naturais (iogurte, fruta e cana de açúcar, bifidus-culture ActiRegularis)</p>	<p>Iogurte com apenas 6 ingredientes (Leite, açúcar branco, fruta amido de milho, aroma e corante natural)</p>	<p>Mistura 100% natural de iogurte e quark com fruta e sem a adição de aditivos artificiais (Iogurte, quark, açúcar branco, fruta (pêssego, maracujá), amido de milho, sumo de limão, aroma natural)</p>	<p>Iogurte com 7 ingredientes naturais e sem ingredientes artificiais (Leite, açúcar branco, água, concentrado de proteína de leite, amido de milho, sabor natural de baunilha, concentrado de sumo de limão)</p>	<p>Iogurte com Stevia, sem adição de açúcar extra e livre de corantes e aromas artificiais (Iogurte, morango, eritritol, frutoligosacarídeos, sumo de limão, sumo concentrado de raiz de beterraba, aroma natural e extrato de <i>stevia</i>)</p>
Posicionamento	Sem aditivos/conservantes, sem glúten, alergénicos (baixo teor de/reduzido/sem)	Sem aditivos/conservantes, 100% natural	100% natural, gordura (baixo teor de/Sem/Reduzida)	Sem aditivos/conservantes		Sem aditivos/conservantes, 100% natural, gordura (baixo teor de/reduzida)	Sem aditivos/conservantes, 100% Natural	Sem aditivos/conservantes, açúcar (baixo teor de/sem/reduzido)

4. Materiais e Métodos

4.1 Amostras

Os preparados de fruta utilizados neste trabalho tiveram duas origens: foram utilizadas 8 polpas comerciais diferentes, obtidas por vários fornecedores, sendo duas delas referentes ao morango, estas foram usadas para o estudo do efeito da concentração da polpa, tratamentos com pectina metil-esterase (PME) e cálcio nas características de teor de sólidos solúveis (TSS), pH, análise de açúcares e viscosidade, também foram utilizadas duas polpas frescas, obtidas a partir de pedaços de morango e de alperce IQF (*individual quick frozen*) 10*10*10 mm, estas foram usadas para estudar o efeito dos tratamentos térmicos, PME e cálcio nas características de TSS, pH, análise de açúcares e viscosidade. Na **Tabela 3** encontram-se as principais características referentes às polpas comerciais, sendo esta informação facultada pelos respectivos fornecedores.

Tabela 3 - Características das polpas comerciais

Polpa de Fruto	Fornecedor	Condições de obtenção	pH	°Brix	Viscosidade
Morango_1	HUDISA	Puré de morango sem sementes, obtido por fruta lavada e selecionada. Sofre peneiramento e pasteurização, sendo no final embalado asséticamente e refrigerado.	$3,7 \pm 0,5$	$7,5 \pm 1,5$	
Morango_5	HUDISA	Puré de morango com sementes, granulometria de 5mm	3,1 – 3,7	≥ 6	
Maçã	Iberfruta	Obtida por maçãs inteiras e sãs, passa por peneiramento antes de sofrer pasteurização. Embalada em condições asséticas	3,3 – 3,6	14 ± 4	4 - 6 (20°C, 30s, Bostwick)
Manga	Netra Agro B.V.	Fruto tem origem Colombiana sendo a variedade Magdalena River. As mangas são selecionadas, descascadas e pressionadas, obtendo-se um creme homogêneo, sendo no final guardadas asséticamente	< 4	26 - 30	
Marmelo	Iberfruta	Puré obtido com granulometria de 3 mm			

Mirtilo	Bayernwald	Embalado asséticamente	2,7 – 3,4	7 – 11	80 – 300 cP
Limão	Iberfruta	O limão é cortado e a sua casca retirada. Quando o produto estiver preparado é adicionada a casca do limão em pedaços em proporções requeridas. No final o produto é guardado asséticamente	2,5 -2,8 ± 0,2	7 ± 2	
Kiwi	C.A.S.	Fruta com origem italiana, é pasteurizada e guardada asséticamente	<3,8	11-14	12-30 (Bostwick)

4.1.1 Preparação das amostras de polpas comerciais

Após o descongelamento, cada uma das 8 polpas comerciais não diluídas, referenciadas na **Tabela 3**, foram homogeneizadas. A partir destas polpas foram obtidas cinco soluções (600 g), uma com polpa não diluída e outras quatro com polpa diluída em água de forma a no final se obter diluições de 80, 60, 40 e 20% de polpa.

4.1.2 Preparação das amostras de polpas frescas

As polpas de morango e alperce foram obtidas a partir de pedaços de fruta congelada IQF 10*10*10 mm. Após o descongelamento, os pedaços de fruta foram colocados numa despolpadeira, equipada com um crivo de 3 mm de diâmetro, de forma a obter a polpa com a granulometria desejada e uniforme. A caracterização da polpa de morango e alperce foi realizada a partir de dois ensaios diferentes, um que apresentava a polpa não pasteurizada e outro com a polpa submetida previamente a pasteurização. O tratamento térmico à polpa ocorreu dentro de uma panela de indução e a uma temperatura de 95°C durante 5 minutos, sendo arrefecida no final.

4.2 Métodos de tratamento das polpas

As 10 amostras de polpa foram submetidas a três métodos de tratamento. Estes foram aplicados às polpas comerciais, não diluídas e diluídas (80, 60, 40 e 20%), e às polpas obtidas por frutos frescos pasteurizadas e não pasteurizadas. Como controlo, cerca de 150

g de cada solução das 8 polpas comerciais nas diferentes diluições e das polpas frescas não diluídas foram colocadas em 3 frascos (200 mL), sendo cada ensaio realizado em triplicado. Os frascos foram tapados com folha de alumínio para minimizar as perdas de água e colocados dentro de um banho a 95°C, aquecido através de uma placa de aquecimento (VWR ADVANCED VMS-C7), para ocorrer a pasteurização da polpa. Quando atingida esta temperatura foram esperados 5 minutos, sendo depois realizada a sua caracterização.

4.2.1 Adição de Cloreto de Cálcio (CaCl_2)

O ensaio da adição de CaCl_2 foi realizado em triplicado para cada amostra de polpa. Cada diluição foi adicionada em três frascos e aquecida num banho até 40°C, temperatura à qual se adicionou o CaCl_2 . Depois, pasteurizaram-se as soluções a 95°C, durante 5 minutos. A quantidade de CaCl_2 adicionado foi de 1% em relação à quantidade de polpa presente em cada solução.

4.2.2 Adição de Pectina-metilesterase (PME)

A enzima usada para o tratamento das polpas foi a pectina-metilesterase com nome comercial Rapidase FP Super, fornecida pela DSM e com origem fúngica (*Aspergillus niger*). As amostras foram tratadas com 0,1% de enzima relativamente à quantidade de polpa presente em cada solução (150 g). A quantidade de enzima adicionada partiu das informações encontradas na ficha técnica, bem como do conhecimento obtido pela Frulact, através de ensaios prévios realizados a polpas de frutos. As soluções foram incubadas num banho a 40°C durante 30 minutos (tempo e temperatura recomendada pela ficha técnica da enzima comercial). De seguida, procedeu-se à pasteurização a 95°C, durante 5 minutos, inativando também a enzima. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

Para se estudar a influência do tempo e temperatura de incubação da PME na viscosidade das 2 polpas frescas foram realizados ensaios às temperaturas de 30, 40 e 50°C. Para cada temperatura as polpas frescas foram sujeitas a uma variação de tempo de ação da enzima, tendo ficado a incubar durante 30, 40, 50 e 60 minutos. Cada ensaio foi realizado em triplicado. Cerca de 150 g de polpa foram inseridas em frascos de vidro, foi aplicada a PME (0,1% m/m) e colocados os frascos num banho de água à temperatura a ser

avaliada. Após o tempo a ser estudado em cada ensaio, cada frasco foi colocado num banho de água a uma temperatura mais elevada de forma a atingir os 95°C. A pasteurização ocorreu a esta temperatura durante 5 minutos. Foi determinado o TSS, pH e viscosidade das polpas à temperatura ambiente.

4.2.3 Adição de Cloreto de Cálcio e Pectina-metilesterase

O tratamento de cada amostra de polpa, com a adição do CaCl_2 na presença da PME, foi realizado em triplicado. As amostras (150 g) foram colocadas em frascos, onde se adicionou 1% de CaCl_2 e 0,1% de pectina-metilesterase em relação à quantidade de polpa na solução. Os frascos foram imersos num banho a 40°C durante 30 minutos. Após este tempo, pasteurizou-se as amostras a 95°C durante 5 minutos.

4.3 Desenvolvimento de preparados à base de fruta

4.3.1 Preparado de polpa de morango

Para a elaboração de um preparado de polpa de morango teve-se como base duas formulações em produção industrial, sendo uma açucarada e a outra edulcorada. Nas **Tabelas 4 e 5** estão apresentadas as percentagens de cada composto inserido na formulação de cada preparado base, sendo que a percentagem referente aos corantes e aromas da formulação original foi substituída por água. O preparado açucarado e edulcorado não apresentam a mesma quantidade de polpa de morango uma vez que estes são desenvolvidos de acordo com as especificações pedidas por cada cliente.

Tabela 4 - Formulação de preparado industrial de polpa de morango açucarado

Designação – Matérias-primas	Preparado industrial	Preparado industrial sem amido
	% (m/m)	
Polpa de Morango Comercial 3MM	50	50
Água Fria	15,7	17,9
Amido modificado de milho (E1442)	2,2	
Açúcar	32	32
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1

Tabela 5 - Formulação de preparado industrial de polpa de morango edulcorado

Designação – Matérias-primas	Preparado industrial	Preparado industrial sem amido
	% (m/m)	
Polpa de Morango Comercial 3MM	60	60
Água Fria	35	39,4
Amido modificado de milho (E1442)	4,4	
Frutose	0,45	0,45
Aspartame granulado (E951)	0,04	0,04
Acessulfame K (E950)	0,01	0,01
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1

Inicialmente, para a elaboração de cada preparado, foi necessário descongelar a polpa de morango comercial com granulometria de 3 mm. Esta polpa foi depois introduzida numa panela de indução para se seguir com o resto da fórmula. Em cada um dos dois preparados industriais dissolveu-se o amido modificado de milho (E1442) e o sorbato de potássio granulado (E202) com a água disponível para cada fórmula. No caso da fórmula açucarada o segundo ingrediente a ser adicionado foi o açúcar, sendo que na fórmula edulcorada foram a frutose, o aspartame e o acessulfame K. Sempre com alguma agitação, seguiu-se com a introdução da solução de amido e de sorbato, elevou-se a temperatura e pasteurizou-se cada preparado aos 95°C durante 5 minutos. Após o arrefecimento para os 40-45°C, embalaram-se os preparados em recipientes de plástico. Foram feitas medições de TSS, pH e viscosidade à temperatura ambiente após 24 horas. Como futura comparação, foram realizados os mesmos preparados industriais sem a introdução do amido presente na fórmula original (preparado industrial sem amido), sendo a proporção deste adicionada na quantidade de água.

De forma a tentar diminuir a adição de aditivos, substituiu-se a polpa de morango comercial 3 mm pela polpa fresca de morango não pasteurizada e funcionalizada com o tratamento da PME. Na **Tabela 6** e **7** estão apresentadas as várias formulações realizadas para a composição de um novo preparado açucarado e edulcorado de morango, respetivamente. Assim, a elaboração de cada preparado iniciou-se com a adição da PME (0,1% (m/m)) na polpa fresca de morango não pasteurizada durante 60 minutos a 40°C. Depois da incubação, seguiu-se os mesmos passos referidos acima para a elaboração das fórmulas dos preparados industriais, quer açucarado quer edulcorado. Tentando minimizar a incorporação de amido, foram elaborados preparados com apenas 20 e 40% do amido

introduzido na fórmula original. Foi realizado também um preparado com a percentagem total de amido para efeitos de comparação.

Tabela 6 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado açucarado à base de fruta com polpa de morango não pasteurizada e sujeita ao tratamento com PME.

Designação – Matérias-primas	PadrãoA NP	PMA NP1	PMA NP2	PMA NP3	PMA NP4
	% (m/m)				
Polpa fresca de Morango 3mm (não pasteurizada)	50				
Polpa fresca de Morango 3mm (não pasteurizada e funcionalizada)		50	50	50	50
Água Fria	17,9	17,9	17,46	17,02	15,7
Amido modificado de milho (E1442)			0,44	0,88	2,2
Açúcar	32	32	32	32	32
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

(PadrãoA_NP – Preparado padrão açucarado, com polpa não pasteurizada e sem tratamento com PME; PMA_NP1 – Preparado de morango açucarado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME; PMA_NP2 - Preparado de morango açucarado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 20% de amido da fórmula original; PMA_NP3 - Preparado de morango açucarado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 40% de amido da fórmula original; PMA_NP4 - Preparado de morango açucarado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 100% de amido da fórmula original)

Tabela 7 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado edulcorado à base de fruta com polpa de morango não pasteurizada e sujeita ao tratamento com PME.

Designação – Matérias-primas	PadrãoE NP	PME NP1	PME NP2	PME NP3	PME NP4
	% (m/m)				
Polpa de Morango 3mm (não pasteurizada)	60				
Polpa de Morango 3mm (não pasteurizada e funcionalizada)		60	60	60	60
Água Fria	39,4	39,4	38,52	37,64	35
Amido modificado de milho (E1442)			0,88	1,76	4,4
Frutose	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Aspartame granulado (E951)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Acessulfame K (E950)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

(PadrãoE_NP – Preparado padrão edulcorado, com polpa não pasteurizada e sem tratamento com PME; PME_NP1 – Preparado de morango edulcorado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME; PME_NP2 - Preparado de morango edulcorado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 20% de amido da fórmula original; PME_NP3 - Preparado de morango edulcorado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 40% de amido da fórmula original; PME_NP4 - Preparado de morango edulcorado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 100% de amido da fórmula original)

Um outro ensaio com a polpa de morango também foi realizado. Neste caso, após o tratamento com a PME (1h a 40°C), a polpa sofreu uma pasteurização durante 5 minutos a 95°C. Depois do arrefecimento, a polpa foi introduzida como ingrediente na fórmula do preparado açucarado e edulcorado. Os diferentes preparados das **Tabelas 8 e 9** foram realizados com o procedimento descrito acima, com exceção da pasteurização prévia da polpa.

Tabela 8 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado açucarado à base de fruta com polpa de morango pasteurizada após tratamento com a enzima PME.

Designação – Matérias-primas	PadrãoA_P	PMA_P1	PMA_P2	PMA_P3	PMA_P4
	% (m/m)				
Polpa de Morango 3mm (pasteurizada)	50				
Polpa de Morango 3mm (pasteurizada após funcionalização)		50	50	50	50
Água Fria	17,9	17,9	17,46	17,02	15,7
Amido modificado de milho (E1442)			0,44	0,88	2,2
Açúcar	32	32	32	32	32
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

(**PadrãoA_P** – Preparado padrão açucarado, com polpa pasteurizada e sem tratamento com PME; **PMA_P1** – Preparado de morango edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME; **PMA_P2** – Preparado de morango edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 20% de amido da fórmula original; **PMA_P3** – Preparado de morango edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 40% de amido da fórmula original; **PMA_P4** – Preparado de morango edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 100% de amido da fórmula original)

Tabela 9 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado edulcorado à base de fruta com polpa de morango pasteurizada após o tratamento com a enzima PME.

Designação – Matérias-primas	PadrãoE_P	PME_P1	PME_P2	PME_P3	PME_P4
	% (m/m)				
Polpa de Morango 3mm (pasteurizada)	60				
Polpa de Morango 3mm (pasteurizada após funcionalização)		60	60	60	60
Água Fria	39,4	39,4	38,52	37,64	35
Amido modificado de milho (E1442)			0,88	1,76	4,4
Frutose	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Aspartame granulado (E951)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Acessulfame K (E950)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

(**PadrãoE_P** – Preparado padrão edulcorado, com polpa pasteurizada e sem tratamento com PME; **PME_P1** – Preparado de morango edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME; **PME_P2** – Preparado de morango edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 20% de amido da fórmula original; **PME_P3** – Preparado de morango edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 40% de amido da fórmula original; **PME_P4** – Preparado de morango edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 100% de amido da fórmula original)

4.3.2 Preparado de polpa de Alperce

Foram realizados preparados de polpa fresca de Alperce na mesma gama dos realizados para a polpa de Morango. Neste caso, não se partiu de preparados industriais de alperce, mas teve-se como base os preparados industriais açucarados e edulcorados de morango realizados no ponto 4.3.1, sendo a única diferença a substituição da polpa de morango pela polpa de alperce. Assim, manteve-se como objetivo a diminuição da incorporação do amido de forma a atingir os mesmos parâmetros finais dos preparados industriais de morango. Nas **Tabelas 10 e 11** apresentam-se as percentagens de cada composto para a realização dos preparados de alperce açucarados e edulcorados, respetivamente, incluindo o ensaio com a polpa de alperce não pasteurizada após o tratamento com a PME. Cada preparado segue a mesma linha de procedimento explicada no ponto 4.3.1, com exceção do tempo de incubação da polpa de alperce não pasteurizada com a PME, que é apenas de 30 minutos a 40°C.

Do mesmo modo, foram realizados preparados de alperce açucarados e edulcorados incorporando a polpa de alperce pasteurizada após a enzimação com PME. Nas **Tabelas 12 e 13** são apresentadas as proporções de cada ingrediente para a formulação dos preparados açucarados e edulcorados, respetivamente. O procedimento é idêntico ao do ponto 4.3.1, sendo que o tempo de incubação da polpa de alperce com a PME é de apenas 30 minutos a 40°C.

Tabela 10 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado açucarado à base de fruta com polpa de alperce não pasteurizada após tratamento com PME.

Designação – Matérias-primas	PadrãoA_NP	PAA_NP1	PAA_NP2	PAA_NP3	PAA_NP4
	% (m/m)				
Polpa de Alperce 3mm (não pasteurizada)	50				
Polpa de Alperce 3mm (não pasteurizada após funcionalização)		50	50	50	50
Água Fria	17,9	17,9	17,46	17,02	15,7
Amido modificado de milho (E1442)			0,44	0,88	2,2
Açúcar	32	32	32	32	32
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

(**PadrãoA_NP** – Preparado padrão açucarado, com polpa não pasteurizada e sem tratamento com PME; **PAA_NP1** – Preparado de alperce açucarado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME; **PAA_NP2** - Preparado de alperce açucarado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 20% de amido da fórmula original; **PAA_NP3** - Preparado de alperce açucarado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 40% de amido da fórmula original; **PAA_NP4** - Preparado de alperce açucarado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 100% de amido da fórmula original)

Tabela 11 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado à base de fruta edulcorado com polpa de alperce não pasteurizada.

Designação – Matérias-primas	PadrãoE NP	PAE NP1	PAE NP2	PAE NP3	PAE NP4
	% (m/m)				
Polpa de Alperce 3mm (não pasteurizada)	60				
Polpa de Alperce 3mm (não pasteurizada após funcionalização)		60	60	60	60
Água Fria	39,4	39,4	38,52	37,64	35
Amido modificado de milho (E1442)			0,88	1,76	4,4
Frutose	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Aspartame granulado (E951)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Acessulfame K (E950)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

(**PadrãoE_NP** – Preparado padrão edulcorado, com polpa não pasteurizada e sem tratamento com PME; **PAE_NP1** – Preparado de alperce edulcorado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME; **PAE_NP2** - Preparado de alperce edulcorado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 20% de amido da fórmula original; **PAE_NP3** - Preparado de alperce edulcorado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 40% de amido da fórmula original; **PAE_NP4** - Preparado de alperce edulcorado com polpa não pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 100% de amido da fórmula original)

Tabela 12 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado açucarado à base de fruta com polpa de alperce pasteurizada após tratamento com a enzima PME.

Designação – Matérias-primas	PadrãoA_P	PAA_P1	PAA_P2	PAA_P3	PAA_P4
	% (m/m)				
Polpa de Alperce 3mm (pasteurizada)	50				
Polpa de Alperce 3mm (pasteurizada após funcionalização)		50	50	50	50
Água Fria	17,9	17,9	17,46	17,02	15,7
Amido modificado de milho (E1442)			0,44	0,88	2,2
Açúcar	32	32	32	32	32
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

(**PadrãoA_P** – Preparado padrão açucarado, com polpa pasteurizada e sem tratamento com PME; **PAA_P1** – Preparado de alperce açucarado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME; **PAA_P2** - Preparado de alperce açucarado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 20% de amido da fórmula original; **PAA_P3** - Preparado de alperce açucarado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 40% de amido da fórmula original; **PAA_P4** - Preparado de alperce açucarado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 100% de amido da fórmula original)

Tabela 13 - Proporção de cada componente inserido na formulação do preparado edulcorado à base de fruta com polpa de alperce pasteurizada.

Designação – Matérias-primas	PadrãoE P	PAE P1	PAE P2	PAE P3	PAE P4
	% (m/m)				
Polpa de Alperce 3mm (pasteurizada)	60				
Polpa de Alperce 3mm (pasteurizada após funcionalização)		60	60	60	60
Água Fria	39,4	39,4	38,52	37,64	35
Amido modificado de milho (E1442)			0,88	1,76	4,4
Frutose	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Aspartame granulado (E951)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Acessulfame K (E950)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Sorbato Potássio Granulado (E202)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

(**PadrãoE_P** – Preparado padrão edulcorado, com polpa pasteurizada e sem tratamento com PME; **PAE_P1** – Preparado de Alperce edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME; **PAE_P2** - Preparado de Alperce edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 20% de amido da fórmula original; **PAE_P3** - Preparado de Alperce edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 40% de amido da fórmula original; **PAE_P4** - Preparado de Alperce edulcorado com polpa pasteurizada após tratamento com a PME e com a adição de 100% de amido da fórmula original)

4.3.3 Preparados *FruitOnly*

Os preparados *FruitOnly* tinham como objetivo evitar o uso de aditivos, como pectina, amido ou goma guar, mantendo a estabilidade da suspensão de pedaços de fruta sem a presença de sinerese. Nesta fase, foram realizados preparados de fruta com pedaços, na versão de morango e alperce.

4.3.3.1 Morango

Inicialmente, foram elaborados dois preparados tipo constituídos por concentrado de morango, água, açúcar, pedaços de morango, e alguns aditivos como amido modificado, pectina, goma guar e sorbato de potássio. O preparado tipo 1 tinha uma proporção de polpa, pedaços de fruta e açúcar de 20:60:18, enquanto o preparado tipo 2 apresentava a proporção 45:40:13, respetivamente (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Formulações dos preparados tipo de morango com diferentes proporções de cada componente.

Matéria-prima	Preparado tipo 1 (20:60:18)	Preparado tipo 2 (40:45:13)
	% (m/m)	
Con. Puré Morango 21BX (x3,0) S/GR	7,85	15
Água	11,8	29,25
Açúcar	18	13
Pedaços de Morango IQF 10*10*10 mm	60	40
Amido modificado de milho (E1442)	1,9	2,5
Pectina LMA (E440ii)	0,25	0,15
Sorbato de Potássio	0,1	0,1
Goma Guar	0,1	

A produção destes dois preparados é semelhante, com a exceção de que o preparado tipo 2 não apresenta a goma guar na sua formulação. A elaboração de cada preparado (1 kg) iniciou-se com o descongelamento do concentrado de morango. A quantidade certa deste, 78,5 e 150 g para o preparado tipo 1 e 2, respetivamente, foi colocada numa panela de indução. Após aquecimento (até 20°C), foi adicionado um pouco de água de modo a dissolver o concentrado. Posteriormente, foram adicionados os pedaços de morango e o açúcar, agitando sempre muito bem. De seguida, juntaram-se as soluções de amido, sorbato e goma guar, previamente realizadas com a dispersão em água fria. Após se elevar a temperatura para perto dos 40°C foi adicionada a solução de pectina, tendo esta sido preparada com a ajuda de uma homogeneizador de líquidos e com dispersão em água quente (80°C). Por fim, aqueceu-se o preparado até atingir os 95°C e esperou-se 5 minutos a esta temperatura para ocorrer a pasteurização. O preparado foi deixado a arrefecer e quando atingiu os 40°C foi embalado em recipientes de plástico descartáveis.

Foram elaboradas 3 formulações de preparados com pedaços de morango apresentando a polpa funcionalizada (P_F1, P_F2, P_F3) (**Tabela 15**), variando-se apenas a proporção, como o açúcar, polpa e pedaços de morango. Para todas as formulações foi realizado o respetivo preparado padrão, em que se mantiveram as mesmas quantidades de cada componente, sendo a única diferença a incorporação da polpa fresca de morango não funcionalizada com a PME. Estes preparados continham apenas 5 ingredientes: a polpa e os pedaços de morango, água, açúcar e sorbato de potássio.

Tabela 15 - Formulações de preparados *FruitOnly* de Morango

Matéria-prima	Padrão 1	P F1	Padrão 2	P F2	Padrão 3	P F3
	% (m/m)					
Polpa de morango (3mm)	20		40		45	
Polpa de morango funcionalizada (3mm)		20		40		45
Água	1,866	1,866	1,866	1,866	1,866	1,866
Açúcar	18	18	18	18	13	13
Pedaços de morango IQF	60	60	40	40	40	40
Sorbato de Potássio	0,134	0,134	0,134	0,134	0,134	0,134

A elaboração destas formulações iniciou-se com o descongelamento da quantidade de polpa necessária. Esta polpa foi obtida pela transformação de pedaços de morango, como descrito no ponto **4.1.2**. De seguida, a polpa foi ligeiramente aquecida (35°C) e colocada num recipiente de plástico para ser incubada a 40°C, durante uma hora, com 0,1% (m/m) de PME. Após o tempo de incubação, a polpa foi adicionada numa panela de indução e acrescentaram-se os pedaços de morango, agitando muito bem. Depois, foi incorporado o açúcar e a solução de sorbato de potássio com água. Pasteurizaram-se os preparados a 95°C durante 5 minutos, deixaram-se arrefecer e quando atingiram os 40°C embalsaram-se em recipientes de plástico.

4.3.3.2 *Alperce*

Os constituintes para a elaboração dos preparados tipo para o alperce estão descritos na **Tabela 16**. A sua diferença para os preparados tipo de morango, anteriormente descritos, encontra-se em algumas matérias-primas, como o concentrado e os pedaços de alperce, bem como nas proporções de concentrado de alperce e água no preparado tipo 2. A elaboração deste preparado é idêntica à descrita para os preparados tipo do morango, ponto **4.3.3.1**.

Tabela 16 - Formulações dos preparados tipo de alperce com diferentes proporções de cada componente.

Matéria-prima	Preparado tipo 1 (20:60:18)	Preparado tipo 2 (40:45:13)
	% (m/m)	
Con. Puré Alperce 31BX (x2,8)	7,85	16
Água	11,8	28,35
Açúcar	18	13
Pedaços de Alperce	60	40
Amido modificado de milho (E1442)	1,9	2,5
Pectina LMA (E440ii)	0,25	0,15
Sorbato de Potássio	0,1	0,1
Goma Guar	0,1	

Na **Tabela 17** são apresentadas as formulações dos preparados realizados com a polpa não pasteurizada de alperce. Esta polpa, tal como descrito anteriormente, foi obtida pela transformação de pedaços de alperce e foi sujeita ao tratamento com a PME aos 40°C durante 30 minutos. Os preparados de polpa funcionalizada 1 e 2 (P_F1 e P_F2, respetivamente) foram constituídos com este tratamento na polpa. A diferença para o P_F3 foi no tempo de enzimação da polpa, que durou apenas 20 minutos. Para cada alteração nas quantidades de cada componente foi elaborado um padrão com a introdução da polpa de alperce não sujeita ao tratamento. O restante procedimento efetuado para cada formulação é idêntico ao apresentado para as formulações de morango (ponto 4.3.3.1).

Tabela 17 - Formulações de preparados *FruitOnly* de alperce

Matéria-prima	Padrão1	P_F1	Padrão2	P_F2	P_F3
	%(m/m)				
Polpa de alperce (3mm)	20		45		
Polpa de alperce (3mm) funcionalizada		20		45	45
Água	1,866	1,866	1,866	1,866	1,866
Açúcar	18	18	13	13	13
Pedaços de alperce	60	60	40	40	40
Sorbato	0,134	0,134	0,134	0,134	0,134

4.4 Avaliação da capacidade de suspensão de pedaços e presença de sinerese

A capacidade de suspensão de pedaços de fruta foi estudada nas polpas comerciais e nos preparados *FruitOnly* de morango e alperce. Na avaliação realizada com as polpas comerciais, na presença ou ausência de tratamento, teve-se como objetivo perceber qual a concentração mínima de polpa capaz de suspender os pedaços de fruta. Numa primeira fase, prepararam-se as soluções de polpa não diluída e diluída (80, 60 40 e 20%) e adicionaram-se cerca de 120 g de cada uma em copos (200 mL). Depois, acrescentaram-se 30 g de pedaços de morango congelados IQF 10*10*10 mm, sendo que no final obteve-se 80% de solução de polpa e 20% de pedaços. Após a aplicação do respetivo tratamento, os copos foram colocados num banho a 95°C, e quando atingida esta temperatura esperou-se 5 minutos. Deixaram-se arrefecer os copos à temperatura ambiente, com agitação. Quando a solução estava nos 35-45°C, foi transferida para copos mais altos e estreitos (200 mL). Em relação aos preparados *FruitOnly* (preparado P_F3 de morango e preparado P_F3 de alperce), após 24 h da realização destes e dos respetivos padrões com a polpa não funcionalizada, de acordo com o ponto 4.3.3, cada preparado foi colocado em provetas de 1000 mL. O volume entre cada preparado do mesmo fruto foi nivelado.

A avaliação da suspensão de pedaços nas polpas comerciais e nos preparados *FruitOnly* ocorreu durante 5 e 40 dias, respetivamente, verificando se os pedaços permaneciam na mesma posição quando sujeitos apenas à influência da gravidade. Em ambos os casos, foram marcados previamente os pedaços de fruta visíveis com caneta de acetato. A presença de sinerese foi determinada pelo aparecimento de água, ocorrendo desta forma uma separação de fases.

4.5 Análises físico-químicas

4.5.1 Teor de sólidos solúveis (TSS)

Industrialmente, a determinação do teor de sólidos solúveis nas polpas dos frutos permite avaliar a sua qualidade. Desta forma, uma elevada quantidade destes constituintes nas polpas permite uma menor adição de açúcar no produto final. O teor de sólidos solúveis foi realizado através da leitura direta pelo refratómetro (Bellingham + Stanley Ltd, RFM732, com fabrico no Reino Unido), com escala de 0 a 100 °Brix e previamente

calibrado. A medição foi realizada através de uma pequena porção de polpa na lente, à temperatura ambiente, e o resultado foi expresso em °Brix.

4.5.2 pH

O pH é um parâmetro que indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução através de um medidor de pH. Este aparelho é um multivoltímetro e é calibrado com soluções tampão de pH 7, 4 e 1,68. As medições de pH foram efetuadas nas três réplicas de cada amostra de polpa pelo potenciômetro (Consort C860, fabricado na Bélgica) à temperatura ambiente.

4.5.3 Análise de açúcares

4.5.3.1 *Preparação das amostras*

Cada uma das 10 polpas (25-30 g) foram dissolvidas e aquecidas em etanol com uma concentração final de 85% (v/v), quando atingiu a fervura esperou-se 10 minutos. Após este passo, deixou-se arrefecer a amostra e filtrou-se em vácuo com um funil de placa porosa. A amostra foi de novo dispersa em etanol, fervida durante 10 minutos, arrefecida e filtrada. O resíduo restante foi ainda lavado com etanol até não haver extração de cor e depois por acetona. No final, foi deixado numa caixa de petri para secar à temperatura ambiente. A esta amostra seca, à qual se dá o nome de resíduos insolúveis em álcool (AIR) foi guardada num porta-amostras e colocada num exsiccador até análises futuras.

4.5.3.2 Análise de açúcares neutros

Para a análise de açúcares neutros foi necessário uma pré-hidrólise através da adição de 200 µL de H₂SO₄ 72% a tubos de cultura (≈ 10 mL) com cerca de 2-3 mg de amostra, tendo sido cada amostra feita em duplicado. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 3 horas e agitados no vortex cerca de 2 a 3 vezes. A hidrólise ocorreu com a adição de 2,2 mL de água destilada de forma a obter no final uma concentração de H₂SO₄ 1M. Os tubos foram colocados num bloco de aquecimento a 100°C durante 2,5 horas. Após 1h, os tubos foram arrefecidos em água fria e retirou-se uma alíquota de 0,5

mL de cada tubo para a análise de ácidos urônicos. A restante amostra foi colocada de novo no bloco de aquecimento até perfazer as 2,5h. Após a hidrólise, os tubos foram arrefecidos e foi adicionado 200 µL de padrão interno (2-desoxiglucose, 1 mg/mL) preparado anteriormente.

Os passos seguintes foram realizados para ocorrer a redução e acetilação dos monossacarídeos a acetatos de alditol. Foi transferido 1,0 mL de cada solução para outros tubos de cultura, tendo sido adicionado 200 µL de NH₃ a 25% para neutralizar a solução, verificando o pH com papel indicador. A redução dos monossacarídeos foi realizada com a adição de 100 µL de NaBH₄ (15% (m/v) em NH₃ 3M), solução preparada imediatamente antes da adição. Depois os tubos foram agitados e colocados num bloco de aquecimento a 30°C durante 1 hora. Passado este tempo, foi necessário colocar os tubos num banho de gelo para se adicionar duas vezes 50 µL de ácido acético glacial, eliminando o excesso de BH₄⁻.

Para a reação de acetilação houve a transferência de 300 µL de cada solução de amostra para tubos *sovirel* (com tampas de teflon). Estes foram colocados num banho frio e adicionados 450 µL de 1-metilimidazol (catalisador da reação) e 3 mL de anidrido acético (promove a acetilação de alditóis a acetatos de alditol). Os tubos foram agitados muito bem e incubados num bloco de aquecimento a 30°C durante 30 minutos. Passado este tempo, para decompor o excesso de anidrido acético foram adicionados 3,0 mL de água destilada. Para extrair os acetatos de alditol adicionaram-se 2,5 mL de diclorometano e agitou-se muito bem antes de se colocar os tubos na centrífuga (3000 rpm durante 30 segundos). Desta forma, houve uma separação de fases, com os acetatos de alditol na fase orgânica. A fase aquosa foi aspirada por sucção com uma pipeta Pasteur inserida numa torneira de vácuo de água. Repetiu-se o passo descrito anteriormente, tendo sido adicionados 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, agitado muito bem, colocado na centrífuga e aspirado a fase aquosa. A fase orgânica foi lavada, duas vezes, com mais 3 mL de água destilada, tendo-se repetido de novo os passos de agitação, centrifugação e remoção da fase aquosa. Neste último passo, teve-se em atenção a remoção de toda a água existente nas paredes dos tubos. A fase orgânica foi transferida para tubos de *speedvac*, tendo sido evaporado o diclorometano. Adicionou-se 1 mL de acetona anidra e evaporou-se de novo na *speedvac*. Este último passo permitiu que os acetatos de alditol fossem depois dissolvidos com 50 µL de acetona anidra para serem analisados por GC-FID, usando o

Cromatógrafo Perkin Elmer – Claus 400 (CR1) equipado com uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro, 0,15 µm espessura).

Condições:

$V_{\text{injecção}}: 2 \mu\text{L}$

$T_{\text{injector}}: 220^{\circ}\text{C}$

$T_{\text{detector}}: 230^{\circ}\text{C}$

Série: 1

Atenuação: 6

Quebra: 10 min

Programa de temperaturas:

$t_{\text{total}} = 9 \text{ min}$

$T_{\text{inicial}} = 200^{\circ}\text{C}$

Rampa 1 = $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 220°C

$T = 220^{\circ}\text{C}$ durante 7 min

Rampa 2 = $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 230°C

$T_{\text{final}} = 230^{\circ}\text{C}$ durante 1 min

4.5.3.3 *Análise de ácidos urónicos*

Os ácidos urónicos foram quantificados pelo método colorimétrico, tendo sido preparados padrões de concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 µg/mL de ácido galacturónico (200 µg/mL) para a curva de calibração. Para cada concentração foram preparados 3 tubos (1 branco e 2 réplicas) com 0,5 mL de solução padrão. As alíquotas de 0,5 mL de amostra, retiradas durante a hidrólise dos polissacarídeos, foram diluídas com 3 mL de água destilada. Para cada amostra foram retirados 0,5 mL de solução para 3 tubos de ensaio. A todos os tubos (amostras e padrões), colocados num banho de gelo, foi adicionado 3 mL de borato de sódio 50 mM preparado em ácido sulfúrico concentrado. Taparam-se os tubos com folha de alumínio e agitaram-se bem antes de se colocarem num banho a 100°C durante 10 minutos. Depois, foi adicionado, no escuro, 100 µL de MFF (m-fenilfenol 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) NaOH) a 2 dos 3 tubos de cada amostra e padrão, sendo que o tubo sem a adição do MFF representa o branco de cada amostra. Agitou-se muito bem até aparecer cor e colocaram-se os tubos no escuro, durante 30 minutos, para deixar reagir. Por fim, os tubos foram de novo agitados para homogeneizar a solução e a absorvância foi lida a 520 nm.

4.5.4 Viscosidade

A viscosidade é uma característica fundamental dos fluídos, dependente da temperatura e pressão, e representa a resistência das moléculas internas, umas em relação às outras, quando sujeito à alteração da sua forma. Este parâmetro pode ser medido de várias maneiras, como a resistência ao escoamento, mas nesta fase foi medida a resistência ao movimento de rotação de um eixo metálico (*spindle*) quando imerso na amostra.

A medição da viscosidade das amostras foi realizada através de um viscosímetro rotacional (Brookfield DV- II + Pro, fabrico em USA) usando a *spindle* apropriada para cada tipo de polpa, dependendo da sua fluidez. De acordo com o manual do equipamento, a % de torque obtida pela leitura da *spindle* deve estar entre 10 a 100%. Para uma leitura correta, a *spindle* deve ser adicionada no centro do frasco de modo a não tocar nas paredes. A viscosidade foi registada a uma velocidade de rotação de 10 rpm durante 1 minuto. As medições foram realizadas a cerca de 80°C, após algum arrefecimento a 40-45°C e no final à temperatura ambiente (20°C).

4.5.5 Índice de Bostwick

A consistência foi avaliada com o chamado consistómetro de Bostwick. Este aparelho é bastante utilizado na indústria alimentar para estabelecer padrões de alguns alimentos processados, bem como avalia a qualidade final do produto [74, 75]. Cerca de 100 mL de cada amostra, à temperatura ambiente, foi colocada num compartimento próprio do consistómetro. O índice de Bostwick é expresso pela distância (cm) que o preparado percorre durante 60 segundos após a abertura da comporta. Um elevado índice de Bostwick indica uma baixa consistência do preparado de fruta, ou seja, uma baixa resistência ao escoamento. Pelo contrário, um baixo índice Bostwick revela uma elevada consistência do preparado, resistindo este ao escoamento. O consistómetro poderá apresentar um erro de ± 2 cm.

4.6 Análise Sensorial

Os preparados de morango e alperce com pedaços foram sujeitos a uma análise sensorial. A sua avaliação foi feita após aplicação, numa dosificação de 20%, em iogurte meio gordo da marca Continente com 8% de açúcar. Uma vez que a cor diferenciava as amostras quando aplicadas em iogurte, não foi possível a aplicação do teste triangular. Sendo assim, foram realizados dois testes de preferência pareados, um com o preparado *FruitOnly* (P_F3) de morango (proporção 45:40:13) em relação ao respetivo preparado tipo 2 e o outro com o preparado *FruitOnly* (P_F3) de alperce em relação ao respetivo preparado tipo 2. Após 48 h da aplicação de cada preparado ao iogurte, foi realizada a análise sensorial por um painel de 30 provadores não treinados. As amostras foram colocadas em copos de plástico, previamente identificados, e cada provador recebeu duas amostras, pretendendo-se saber qual a preferência de uma amostra em relação a outra. Para a análise dos resultados utilizou-se a tabela de significância para o teste de comparação pareada (**Anexo 8.1**), verificando-se que em 30 provadores era necessário que houvesse preferência de 20 provadores por uma das amostras para atingir um nível de significância de 5%.

4.7 Análise Estatística

Os ensaios das polpas comerciais e frescas foram delineados de forma completamente casual, com 3 réplicas de cada amostra. A análise de resultados foi feita por análise de variância unifatorial de forma a verificar a igualdade de duas ou mais médias populacionais. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o *software* IMB SPSS Statistic 19,0. Quando se observaram interações significativas entre dois fatores, foi realizada uma separação de médias utilizando o teste de Duncan com um nível de significância de 0,05.

Para a análise dos resultados da viscosidade em função da diluição de cada polpa sem tratamento foi feito um ajustamento de função e estimados os seus parâmetros. O modelo matemático foi obtido através do *software* Graphpad Prism.

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização de polpas comerciais

A caracterização de polpas comerciais teve como objetivo avaliar o comportamento das polpas, ricas em pectina, em diferentes concentrações. Desta forma, foram determinados alguns parâmetros físico-químicos em 8 polpas pasteurizadas de acordo com o descrito no ponto 4.2 (controle), nomeadamente o teor de sólidos solúveis, o pH, a viscosidade e a análise de açúcares.

5.1.1 Teor de sólidos solúveis

De acordo com a informação disponível nas fichas técnicas facultadas pelos fornecedores (**Tabela 3**), o teor de sólidos solúveis (**Tabela 18**) para cada polpa não diluída encontra-se dentro do especificado na ficha técnica, com exceção do TSS da polpa de limão que se encontra ligeiramente aumentado. Esta polpa, na concentração de 100%, apresentou um valor de TSS de 9,5 °Brix, sendo o valor de ficha técnica 7,0 °Brix. O fruto que apresenta um maior TSS é a manga (26,3±0,4), o que resulta do facto de esta polpa se encontrar concentrada. De seguida, apresentam-se as polpas da maçã (15,4±0,1 °Brix), marmelo (12,9±0,4 °Brix) e kiwi (12,8±0,3 °Brix) com teores de sólidos solúveis intermédios. Por fim, com valores mais baixos de TSS encontram-se a polpa de morango_1 (7,8±0,1 °Brix), de morango_5 (8,5±0,1 °Brix), mirtilo (8,6±0,1 °Brix) e limão (9,5±0,1 °Brix). Verificou-se com a diminuição da concentração de polpa que o teor de sólidos solúveis diminuiu de forma linear. Assim, garantiu-se que as diluições foram realizadas a partir do mesmo teor de sólidos solúveis da suspensão.

Tabela 18 – Apresentação do teor de sólidos solúveis (°Brix) para cada polpa e suas diluições.

Conc. de polpa (%)	TSS (°Brix)							
	Morango_1	Morango_5	Maçã	Manga	Marmelo	Mirtilo	Limão	Kiwi
100	7,8±0,1	8,5±0,1	15,4±0,1	26,3±0,4	12,9±0,4	8,6±0,1	9,5±0,1	12,8±0,3
80	5,9±0,2	6,9±0,1	13,4±1,7	20,4±0,1	9,6±0,1	7,1±0,1	7,6±0,3	10,7±0,2
60	4,4±0,1	5,2±0,0	9,1±0,1	15,3±0,0	7,4±0,0	5,0±0,1	5,3±0,1	8,0±0,1
40	3,0±0,0	3,3±0,1	6,0±0,1	10,2±0,2	5,1±0,1	3,6±0,1	3,3±0,1	5,3±0,1
20	1,6±0,0	1,5±0,1	3,0±0,0	5,0±0,1	2,4±0,1	1,8±0,1	1,8±0,1	2,6±0,1

Média ± desvio padrão (n=3)

5.1.2 pH

Relativamente ao pH (**Tabela 19**), as polpas não diluídas apresentaram valores dentro dos estabelecidos nas fichas técnicas (**Tabela 3**). Com a diminuição da concentração de polpa verifica-se que os valores de pH sofrem um ligeiro aumento em relação à polpa não diluída. Este resultado deve-se pela diminuição da concentração de H^+ com a diluição da polpa. Das 8 polpas comerciais, os frutos que apresentam o pH mais ácido são o limão (pH=2,5) e o mirtilo (pH=2,9), apresentando ambos valores de pH inferiores a 3. As restantes polpas de frutos apresentam valores de pH próximos entre si, situando-se entre 3,3 e 3,7.

Tabela 19 – Apresentação dos valores de pH para cada polpa e suas diluições

Conc. de polpa (%)	pH							
	Morango_1	Morango_5	Maçã	Manga	Marmelo	Mirtilo	Limão	Kiwi
100	3,5±0,0	3,5±0,0	3,6±0,0	3,7±0,0	3,4±0,0	2,9±0,0	2,5±0,0	3,3±0,0
80	3,5±0,0	3,5±0,0	3,6±0,0	3,7±0,0	3,4±0,0	2,9±0,0	2,5±0,0	3,3±0,0
60	3,3±0,0	3,5±0,0	3,6±0,0	3,8±0,0	3,5±0,0	3,0±0,0	2,5±0,0	3,3±0,0
40	3,6±0,0	3,6±0,0	3,7±0,0	3,9±0,0	3,5±0,0	3,0±0,0	2,6±0,0	3,4±0,0
20	3,7±0,0	3,7±0,0	3,8±0,0	3,9±0,0	3,5±0,0	3,2±0,0	2,7±0,0	3,5±0,0

Média ± desvio padrão (n=3)

5.1.3 Análise de Açúcares

De modo a se caracterizar o material polimérico obtido pelos AIR, foi efetuada uma análise de açúcares neutros e ácidos urónicos para cada polpa comercial (**Tabela 20**).

Os AIR, que refletem o conteúdo das paredes celulares dos frutos, apresentaram um rendimento entre 1,5 e 5,2%, estando estes valores dentro da média obtida pelos frutos. Observa-se que a Manga e o Marmelo apresentam os rendimentos mais elevados de AIR (5,2 e 5,1%, respetivamente), seguido pelo Kiwi (2,5%). Os menores rendimentos do material da parede celular foram obtidos pelos restantes polpas de frutos (1,5-1,9%). Em relação à concentração de açúcares totais, as polpas revelam uma quantidade acima de 652 mg/g. Este valor foi obtido pela polpa de Morango_5, sendo a polpa de Maçã a que apresenta o maior conteúdo de açúcares totais, 976±31 mg/g. Em comparação com o TSS, verifica-se que a manga, apesar de conter o maior teor de sólidos solúveis não se apresenta como a polpa com maior material polimérico em açúcares totais. O AIR da polpa da maçã

é praticamente constituído por açúcares, enquanto as restantes polpas apresentam uma quantidade maior de material não carbo-hidrato, como algumas proteínas [76].

Tabela 20 - Composição de açúcares dos AIR das diferentes polpas de frutos comerciais

Amostra	Rendimento	Composição em açúcares (% molar)								Açúcares
	AIR* (g/kg)	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Á.Ur.	Totais (mg/g)
Morango_1	15	1 ± 0	1 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	3 ± 0	11 ± 1	36 ± 1	36 ± 2	745 ± 32
Morango_5	18	1	1	6	10	2	7	34	38	652
Maçã	19	1 ± 0	1 ± 0	11 ± 1	12 ± 1	2 ± 0	9 ± 1	42 ± 3	21 ± 6	976 ± 31
Manga	52	1 ± 0	0 ± 0	15 ± 0	3 ± 0	1 ± 0	8 ± 0	49 ± 0	23 ± 0	711 ± 34
Marmelo	51	1	1	15	13	2	11	35	22	798
Mirtilo	15	1	0	5	16	2	7	38	30	664
Limão	18	1 ± 0	1 ± 0	10 ± 0	5 ± 0	3 ± 0	8 ± 0	26 ± 0	45 ± 0	854 ± 77
Kiwi	25	1	0	3	6	2	8	61	19	824

Média ± desvio padrão (n=2)

Nota: Morango_5, Marmelo, Mirtilo, Kiwi e Morango apresentam os resultados referentes a uma amostra, sem réplicas.

*O rendimento é expresso em g do peso do material seco por kg de peso fresco de polpa

De uma forma geral, a composição de açúcares das diferentes polpas é idêntica. Estas apresentam como açúcares maioritários a glucose (32-61% molar) e os ácidos urónicos (19-45% molar). A arabinose (3-18 % molar), xilose (3-16% molar) e galactose (7-12% molar) foram detetadas em quantidades inferiores. Como açúcares minoritários encontram-se a ramnose (1-2 % molar), fucose (0-1 % molar) e manose (1-3 % molar). Em todas as polpas, a abundância do resíduo glucose é deduzida, predominantemente, pela hidrólise da celulose [77, 78], sendo a polpa de Kiwi a que apresenta este resíduo em maior quantidade e, pelo contrário, a polpa de Limão a que contém menos abundância. A elevada composição de ácidos urónicos, maioritariamente ácido galacturónico, sugere a presença de polissacarídeos pécticos, os resíduos de arabinose e a galactose inferem a ramificação deste tipo de polissacarídeo [14, 77, 79]. A polpa que se destaca com maior composição de resíduos de ácidos urónicos é a de Limão, sendo a polpa de Kiwi a que contém menor abundância. Este resultado poderá advir de uma maior solubilização ou degradação dos polissacarídeos pécticos presentes no kiwi [80]. De acordo com os resultados referidos por outros autores, a polpa de Kiwi aqui estudada apresenta quantidades superiores no resíduo

de glucose e menores no de ácido urónico [80]. A quantidade de açúcares da polpa de limão é muito semelhante à encontrada pela análise do AIR do albedo do limão [76, 81]. Os polissacarídeos hemicelulósicos também fazem parte da parede celular dos frutos. Estes poderão estar representados pela presença dos resíduos de xilose, manose, fucose e glucose, representando xiloglucanas ou mananas, por exemplo [78, 80, 82].

Através da comparação da percentagem molar dos resíduos das polpas de morango, pode-se concluir que a composição em açúcares está muito próxima. Apenas existe uma menor quantidade do resíduo de xilose e galactose nas polpas de Morango_1 e Morango_5, respetivamente. A composição de açúcares foi essencialmente a mesma descrita por Legentil A.*et al* [83].

A composição de açúcares da polpa da maçã, em comparação com a bibliografia, revela que os resíduos de xilose e glucose se encontram em maiores quantidades. Estes resíduos em conjunto com a fucose e galactose constituem a fucogalactoxiloglucana, que é a principal hemicelulose da parede celular da maçã. Tem sido descrito que os polissacarídeos pécticos da maçã são ricos em xilogalacturonanas, podendo a abundância dos resíduos de xilose advir deste domínio [77, 82].

Relativamente à polpa de Manga, a quantidade de açúcares mais abundante descrita na bibliografia para as espécies *Améliorée* e *Mango* indica que existem diferenças na quantidade de alguns resíduos de açúcares. Através desta comparação, é possível concluir que a polpa de manga aqui estudada apresenta menores quantidades de ramnose, manose e galactose, enquanto a glucose se encontra mais elevada [84]. Com isto, poderá apresentar polissacarídeos celulósicos em maiores quantidades e, pelo contrário, uma menor quantidade de açúcares presentes nas cadeias laterais ramificadas ao polissacarídeo péctico.

A polpa de marmelo contém as quantidades de açúcares obtidas muito próximas do marmelo Japonês (*Chaenomeles japonica*), exceto a quantidade do resíduo de galactose que se encontra ligeiramente mais elevada [78].

Através da percentagem molar dos resíduos de açúcar da polpa de Mirtilo, verifica-se que o resíduo mais abundante, além da glucose e do ácido urónico, é a xilose. Em relação com as restantes polpas, o mirtilo é a polpa que apresenta este resíduo em maior quantidade. A xilose foi encontrada como sendo o resíduo não celulósico mais abundante nas paredes celulares do fruto mirtilo, sugerindo a presença de xilanas, um dos

componentes minoritários das hemiceluloses [85, 86]. No entanto, em comparação com os dados referidos na bibliografia, o resíduo de xilose encontra-se em menor quantidade na polpa aqui estudada, o mesmo acontece no resíduo de arabinose [86]. Por outro lado, a presença de ácidos urónicos é mais elevada, sugerindo uma maior quantidade de polissacarídeos pécticos [86]. Foi revelado o domínio de homogalacturonana como sendo o componente principal dos polissacarídeos pécticos do mirtilo, pelos resultados obtidos da polpa de mirtilo pode-se sugerir o mesmo, isto porque a percentagem de resíduos de arabinose e galactose é bastante mais baixa que a quantidade de resíduos de ácidos urónicos [85]

5.1.4 Viscosidade

A viscosidade das polpas comerciais foi medida em função da concentração destas. Com o objetivo de avaliar o efeito das diferentes suspensões de polpa, foi estabelecido um modelo que relacionasse a variável viscosidade com a concentração de polpa. Este modelo, permite uma leitura direta da concentração de polpa que garanta uma viscosidade suficiente para a suspensão de pedaços de fruta em preparados *FruitOnly*. Desta forma, tem-se um rápido desenvolvimento de preparados, sendo estes constituídos apenas por pedaços estabilizados em soluções de polpas.

Os dados obtidos, à temperatura ambiente, da viscosidade em função da concentração de cada polpa foram adaptados a um modelo matemático. O melhor modelo que se ajusta aos dados experimentais é a equação de crescimento exponencial (equação 1).

$$\eta = A * \exp(k * c) \quad (\text{equação 1})$$

onde η corresponde à viscosidade da polpa (mPa.s), c à concentração de polpa (%), A e k são constantes da equação. Este modelo tinha sido como o mais adequado para descrever o comportamento reológico entre a viscosidade e a concentração de concentrados de sumo de toranja e polpa de melancia, por exemplo [87, 88]. Na **Tabela 21** estão representados os parâmetros do modelo para cada polpa de fruto estudada. Verifica-se que a regressão efetuada para todas as polpas mostra um bom coeficiente de correlação ($R^2 > 0,977$).

Tabela 21 – Estimativas (\pm intervalo de confiança 95%) para os parâmetros do modelo de crescimento exponencial usado para descrever a viscosidade em função da concentração de polpa presente na solução à temperatura ambiente.

Polpa	A (mPa.s)	k ($\%^{-1}$)	R^2
Morango_1	22,68 \pm 9,32	0,03746 \pm 0,00433	0,983
Morango_5	351,2 \pm 121,3	0,03675 \pm 0,00365	0,988
Maça	63,73 \pm 38,59	0,05290 \pm 0,00621	0,988
Manga	365,9 \pm 175,1	0,03664 \pm 0,00505	0,977
Marmelo	174,1 \pm 41,65	0,05546 \pm 0,00245	0,998
Mirtilo	6,913 \pm 4,456	0,05169 \pm 0,00661	0,985
Limão	11,39 \pm 4,68	0,05196 \pm 0,00843	0,994
Kiwi	26,08 \pm 15,12	0,04393 \pm 0,00602	0,980

Na **Figura 12** estão representados os gráficos que caracterizam a viscosidade de cada polpa em função da gama de concentração estudada. Pode-se verificar que em todas as polpas existe um aumento da viscosidade quando a concentração de polpa na solução é maior. Do ponto de vista molecular, quando a concentração de sólidos aumenta, a viscosidade é mais elevada devido a uma maior interação por ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo [89]. A diminuição da viscosidade pode ser explicada pela redução do teor de solutos de baixo e alto peso molecular, ou seja, pela mudança do conteúdo solúvel e das partículas em suspensão. As alterações da quantidade de polissacarídeos pécicos e outros açúcares, quando as polpas são sujeitas à diluição em água, são os principais fatores responsáveis pelas mudanças na viscosidade [90].

Através dos gráficos de cada polpa, pode-se concluir que os valores de viscosidade são maiores nas concentrações entre 80 e 100%, sendo neste intervalo onde existe grande variabilidade da viscosidade. Por outro lado, a baixas concentrações a viscosidade não sofre grande variação.

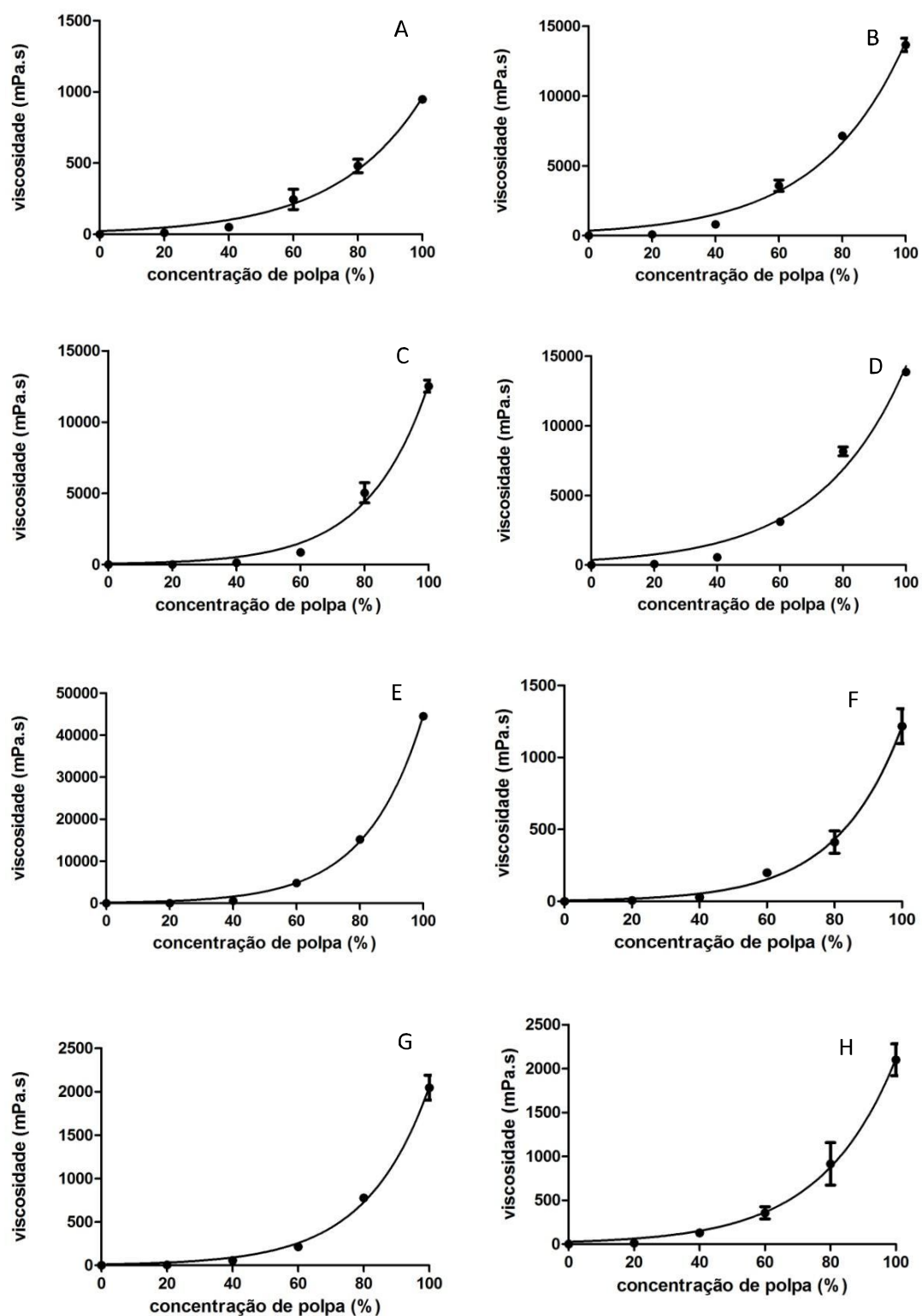


Figura 12 – Representação da viscosidade, à temperatura ambiente, em função da concentração de polpa presente na solução. A – Polpa de Morango_1; B – Polpa de Morango_5; C – Polpa de Maçã; D – Polpa de Manga; E – Polpa de Marmelo; F – Polpa de Mirtilo; G – Polpa de Limão; H – Polpa de Kiwi.

5.2 Influência do tipo de tratamento nas polpas

5.2.1 Polpas comerciais

Com o objetivo de aumentar a viscosidade das 8 polpas comerciais foram aplicados alguns métodos existentes de modo a interagir com os polissacarídeos pécticos presentes endogenamente nos frutos, como o uso de cloreto de cálcio e enzima pectina-metilesterase (PME). Estes tratamentos já foram referenciados em algumas patentes também com o objetivo de alterar as texturas de polpas de frutos. No caso da patente US 2008/0014303 A1 foi aplicada apenas a PME, sob condições de alta pressão, para desesterificar as pectinas naturais presentes nas polpas de frutos frescos, tendo como finalidade a conversão da polpa numa barra de gel estável e a manutenção desta estabilidade durante um determinado tempo de vida de prateleira [91]. Outra ideia sob a proteção de patente, US005639494A, revela o uso da PME no tratamento de alimentos, frutos ou vegetais, para desesterificar pectinas de elevado grau de metil-esterificação e obter pectinas de baixo grau de metil-esterificação, sendo a quantidade de enzima variável e dependente da viscosidade desejada para o produto final. O tipo de pectinas obtido é dependente de iões cálcio, podendo ser adicionado, opcionalmente, CaCl_2 para promover a gelificação, sendo assim possível a preparação de geleias ou compotas sem ser requerida a adição de açúcar [70]. A patente US005869122A revela o uso de CaCl_2 para aumentar a consistência de frutos ou vegetais macerados. Após o material macerado ter sofrido um tratamento térmico, de forma a inativar enzimas que degradam a pectina e outros carbo-hidratos, é adicionado o CaCl_2 numa quantidade suficiente. Assim, com a adição do CaCl_2 , é possível o aumento da consistência de produtos que contenham fruta ou vegetais, como a preparação de geleias, compotas, molhos ou sopas [92].

Na **Tabela 22** estão representados os valores de viscosidade referentes a cada tratamento e concentração de polpa comercial, bem como a análise estatística associada.

Através da análise estatística verifica-se que os valores de *p-value* obtidos ($<0,001$) são todos inferiores ao valor definido para a significância ($\alpha=0,05$). Deste modo, existem diferenças significativas entre os valores de concentração estudados e entre os tratamentos aplicados às polpas, bem como há interação significativa entre o tipo de tratamento e concentração de polpa usada.

Em relação à contribuição individual da concentração de polpa usada na viscosidade, verifica-se que a solução com maior concentração apresenta valores de viscosidade mais elevados para todos os frutos, entre estes o que apresenta maior viscosidade é o marmelo. O Morango_1 é a polpa que apresenta a viscosidade mais baixa em todas as concentrações estudadas. No que diz respeito ao tipo de tratamento usado observa-se que existem vantagens na sua utilização em comparação com o controlo de cada fruto. No caso das polpas de Morango_1 e Kiwi o tratamento com CaCl_2 em conjunto com a PME mostrou ser o mais indicado para o aumento da viscosidade, a presença apenas de CaCl_2 nas polpas de Morango_5 e Manga revelou que este tratamento era o mais eficaz. O tratamento às polpas de Maçã, Marmelo, Mirtilo, Kiwi e Limão, apenas com a PME, permitiu que estas alcançassem uma maior viscosidade.

Como há interação significativa entre os dois fatores estudados, ou seja, entre a concentração e o tipo de tratamento, foi feita uma separação de médias, utilizando o teste de Duncan $\alpha=0,05$. Desta forma, fixou-se o tipo de tratamento e variou-se a concentração de polpa usada.

Tabela 22 - Resultados da viscosidade (média±desvio padrão) em função da concentração, tipo de tratamento para cada fruto e respectiva análise estatística

Fatores	Viscosidade (mPa.s)							
	Morango_1	Morango_5	Maça	Manga	Marmelo	Mirtilo	Limão	Kiwi
Conc. (%)	20	15±12 ^d	136±99 ^e	33±43 ^d	222±219 ^e	74±51 ^d	18±12 ^d	18±10 ^d
	40	54±18 ^d	1052±239 ^d	406±245 ^d	1930±2141 ^d	931±523 ^d	89±64 ^d	141±127 ^d
	60	281±692 ^e	3833±392 ^e	3965±2873 ^e	5077±1986 ^e	10790±9616 ^e	333±199 ^e	819±1017 ^e
	80	647±242 ^b	7397±365 ^b	8800±3755 ^b	13258±4969 ^b	31013±17392 ^b	1221±856 ^b	4682±4629 ^b
	100	1332±355 ^a	16540±3197 ^a	19378±6506 ^a	29158±13754 ^a	69967±28075 ^a	1904±1180 ^a	6019±5741 ^a
Tratamento	Controlo	347±358 ^c	5053±5145 ^b	3708±4955 ^c	5151±5401 ^c	13020±17260 ^b	373±465 ^c	620±792 ^c
	CaCl ₂	545±555 ^b	6452±7258 ^a	5961±8652 ^b	14670±17114 ^a	1585±27823 ^c	518±1083 ^b	631±3187 ^c
	PME	359±425 ^c	*	8916±10802 ^a	9202±10790 ^b	33545±3600 ^a	1450±1550 ^a	5919±6525 ^a
	CaCl ₂ + PME	612±707 ^a	788±584 ^c	3076±3990 ^d	2984±2721 ^d	382±299 ^c	510±507 ^b	2172±2605 ^b
Significância		<i>p</i> -value	<i>p</i> -value	<i>p</i> -value	<i>p</i> -value	<i>p</i> -value	<i>p</i> -value	<i>p</i> -value
	Conc.	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Tratamento.	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Conc. x Tratam.	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

*Não se realizou o ensaio do Morango_5 com a PME porque não se encontrava disponível polpa do mesmo lote

Nota: Para cada fator, letras diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes ($\alpha<0,05$)

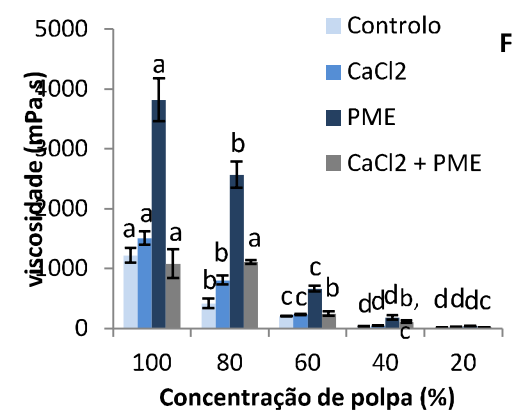
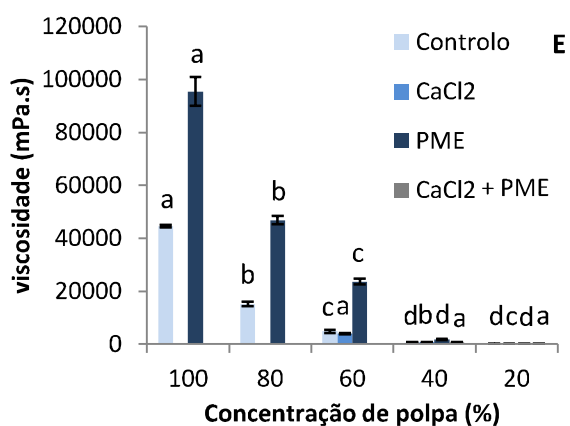
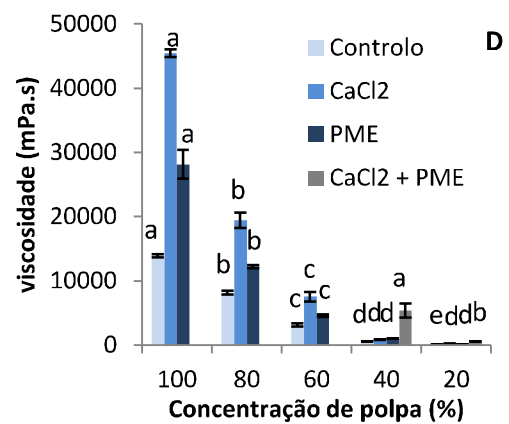
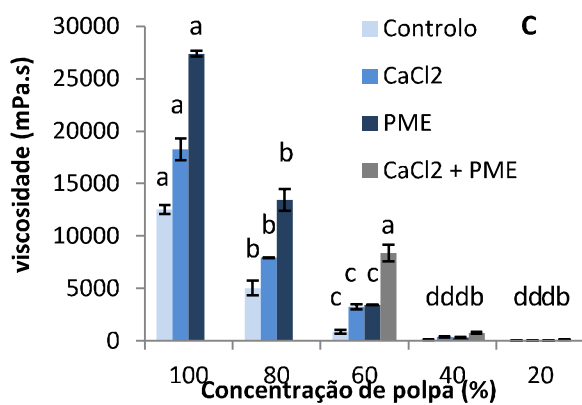
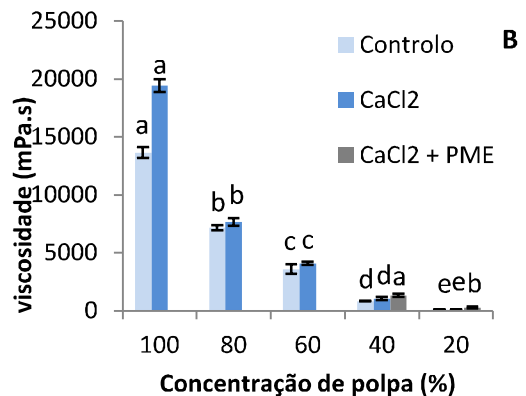
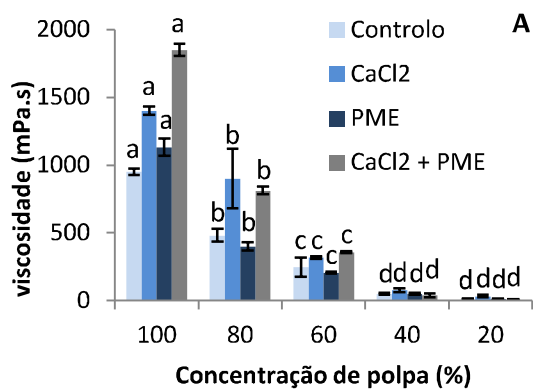
a – média de valores mais elevada e e - média de valores mais baixa

Os resultados da viscosidade obtidos para as polpas comerciais estão representados na **Figura 13**. Pela análise estatística efetuada obteve-se um $p\text{-value} < 0,001$ para todos os casos, sendo assim, verifica-se que ao fixar o tipo de tratamento aplicado à polpa existem diferenças significativas entre as médias de viscosidades obtidas para as diferentes concentrações de polpa estudada. A polpa de Morango_1 e de Kiwi (**Figura 13 – A e H**, respetivamente) apresentam a maior viscosidade com 100% de polpa e com o tratamento de CaCl_2 na presença de PME. Este tratamento é o mais vantajoso nas concentrações de 60 e 40% na polpa de Maçã (**Figura 13–C**) e na de 40% na polpa de Manga (**Figura 13-D**). A adição desta enzima promove a desesterificação aleatória dos polissacarídeos pécticos existentes nestas polpas. Desta forma, ao ocorrer a libertação dos grupos metílicos, os resíduos de ácido galacturónico podem associar-se com os iões Ca^{2+} adicionados via CaCl_2 e presentes na própria polpa [13, 45]. Assim, forma-se o mecanismo “caixa-de-ovos” que promove uma maior associação entre os polissacarídeos pécticos, razão pela qual existe um aumento da viscosidade da polpa [44, 45]. A polpa de Kiwi não apresentou vantagens, em relação à polpa controlo, quando aplicados os restantes tratamentos. No entanto, no caso da polpa de Morango_1, o tratamento com o CaCl_2 também auxiliou a aumentar a viscosidade em relação ao controlo. Este tratamento revelou ser o mais vantajoso quando aplicado à polpa de Morango_5 (**Figura 13-B**), na concentração de 100%, e de Manga, nas concentrações de 100, 80 e 60%. Nestes casos, é sugerida a presença de alguns resíduos de ácido galacturónico com o grupo carboxílico livre para se associarem com os iões cálcio adicionados.

A ação da PME, na polpa de Manga, consegue aumentar a viscosidade em relação ao controlo nas diferentes concentrações. O mesmo tratamento apresentou as viscosidades mais elevadas para a polpa de Marmelo, Mirtilo, Limão (**Figura 13 - E, F, e G**, respetivamente) e para as concentrações de 100 e 80% na polpa da Maçã. A incubação das polpas com esta enzima, de origem fúngica, promove a desesterificação aleatória dos resíduos de ácido galacturónico, diminuindo o grau de metil-esterificação presente nos polissacarídeos pécticos [13, 45]. Contudo, nestes casos, apesar de não ser adicionado o CaCl_2 como fonte de cálcio, ocorre um aumento de viscosidade em relação ao controlo. Isto acontece devido à associação entre os polissacarídeos pécticos e os iões de cálcio presentes intrinsecamente nas polpas. Apesar destes resultados, seria de esperar que a polpa de Mirtilo e Limão, com o tratamento da PME na presença de CaCl_2 apresentasse

uma viscosidade com a mesma intensidade ou superior ao tratamento apenas com a PME, uma vez que a adição de íons cálcio favorece um melhor ambiente para a formação de zonas de junção. Apenas na polpa de Limão se observa vantagens da ação da PME na presença de CaCl_2 em relação ao controle. Ambas as polpas, sendo polpas comerciais, poderão ainda apresentar alguma atividade enzimática. Como industrialmente a pasteurização ocorre para elevadas quantidades de polpa, a temperatura necessária à pasteurização pode não atingir toda a polpa, não ocorrendo uma inativação das enzimas de forma homogênea. Desta forma, seria necessário confirmar esta hipótese através da adição de uma pectina comercial nestas duas polpas, esta pectina iria tornar a polpa mais viscosa. Caso a polpa apresentasse uma diminuição da viscosidade ao longo do tempo poder-se-ia sugerir a presença de atividade enzimática ativa. As enzimas responsáveis pela diminuição da viscosidade em polpas de frutos são a pectina metil-esterase e a poligalacturonase. Ambas as enzimas encontram-se presentes no mirtilo e poderão ser responsáveis pela solubilização dos polissacarídeos pécticos [93]. No caso de limão, este fruto também revela atividade enzimática de pectina metil-esterase e de poligalacturonase [94-96], mas nenhum estudo foi encontrado que indicasse que a ação destas enzimas era a responsável pela diminuição da cadeia dos polissacarídeos pécticos presentes.

Pode-se ainda verificar que algumas viscosidades não estão representadas na **Figura 13**, nomeadamente com o tratamento na presença da PME e CaCl_2 nas concentrações de 100 e 80% na polpa da Maçã e 100, 80 e 60% na polpa de marmelo, manga e morango_5. Constata-se também a ausência do resultado da viscosidade nas concentrações de 100 e 80% na polpa de marmelo com o tratamento do CaCl_2 . Nestes casos, as polpas apresentaram gelificação, tanto após o tempo de incubação como após a pasteurização e arrefecimento da polpa. Devido à agitação durante o ensaio, o gel formado por estas concentrações apresentou sinerese, aspeto que reflete uma separação de fases e que deve ser evitado na indústria alimentar. Este resultado ocorreu provavelmente devido ao excesso de íons cálcio que não participa na dimerização entre as cadeias dos polissacarídeos pécticos. Desta forma, a adição excessiva de íons cálcio promove a desintegração da rede formada entre os íons cálcio e os resíduos de ácido galacturónico desesterificados pela PME. Esta quebra da estrutura do gel promove a libertação da água retida no gel. Uma forma de o evitar era a adição de uma quantidade de íons cálcio numa proporção de 50% em relação à quantidade de ácidos galacturónicos livres [7, 9, 40].



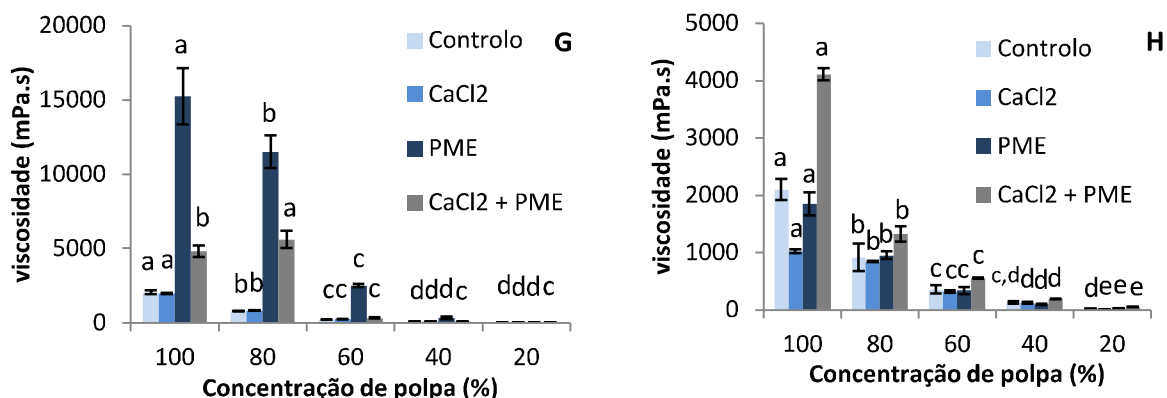


Figura 13 - Apresentação da viscosidade das polpas comerciais, à temperatura ambiente, para todas a concentrações e tratamentos estudados, respetiva análise estatística. A – Polpa de Morango_1; B – Polpa de Morango_5; C – Polpa de Maçã; D – Polpa de Manga; E – Polpa de Marmelo; F – Polpa de Mirtilo; G – Polpa de Limão; H – Polpa de Kiwi. (Nota: Não estão representados valores da viscosidade para algumas polpas nas concentrações de 100, 80 e 60% com o tratamento CaCl₂ e CaCl₂ + PME porque a solução de polpa gelificou, não tendo sido realizada a sua medição.)

5.2.1.1 Influência da temperatura na viscosidade das polpas

A temperatura tem um papel importante nas características reológicas dos produtos alimentares, estando relacionada com a energia interna destes. Quando sujeita a alterações, a temperatura tem a capacidade de influenciar a viscosidade de uma polpa [88, 97]. Este último parâmetro é uma propriedade fundamental para a aplicação da tecnologia alimentar, como por exemplo, no desenvolvimento de processos alimentares, em equipamentos de processamento, no controlo e avaliação da qualidade de produtos e na compreensão da estrutura de alimentos [90].

Neste trabalho, apenas foi avaliada a viscosidade a três diferentes temperaturas, perto dos 80°C, ou seja, logo a seguir ao tempo de pasteurização, após o arrefecimento da polpa, aos 40°C, temperatura à qual ocorre o embalamento dos preparados de fruta, e à temperatura ambiente, viscosidade final que o produto alimentar irá apresentar. Nas três temperaturas medidas pretendia-se que a polpa não apresentasse gelificação. Este resultado não era desejado uma vez que durante o processamento é exigida a agitação da polpa, provocando a destruição da estrutura do gel e o aparecimento de efeitos indesejáveis, como sinerese, quando a polpa fosse inserida num preparado de fruta.

De uma forma geral, pela análise das **Figuras 14 à 21**, a viscosidade de todas as polpas comerciais às diferentes concentrações aumenta com a diminuição da temperatura, quer no controlo quer com a aplicação dos tratamentos. O efeito da temperatura na viscosidade de uma polpa, a uma velocidade de rotação constante, é relacionado por uma equação de Arrhenius,

$$\eta = \eta_0 \exp \left(\frac{E_a}{RT} \right)$$

em que η é a viscosidade, η_0 uma constante pré-exponencial, E_a a energia de ativação, R a constante universal dos gases e T a temperatura absoluta (K) [88, 89, 97, 98]. Quando a solução de polpa é aquecida, a viscosidade diminui porque a elevadas temperaturas a energia térmica e a movimentação das partículas é maior. Devido a isto, as distâncias intermoleculares aumentam e ocorre uma diminuição da interação entre as partículas, permitindo um melhor escoamento ou uma menor resistência por estas partículas existentes na polpa [89, 97]. Visualizando os gráficos da viscosidade pode-se concluir que algumas polpas não apresentam o resultado de viscosidade para todas as temperaturas, isto porque apresentaram gelificação nas concentrações mais elevadas de polpa. Este resultado ocorreu, principalmente, pela aplicação do tratamento com a enzima PME na presença de CaCl_2 nas polpas de Morango_5, Maçã, Manga e Marmelo, sendo que neste último fruto a gelificação também ocorreu na presença apenas de CaCl_2 . Uma vez que estas polpas apresentaram gelificação perto dos 80°C, seria de esperar o aumento da força do gel com a diminuição da temperatura e, desta forma, estes resultados mostraram que estes tratamentos, quando aplicados a algumas concentrações de polpa, não eram os mais eficazes para atingir o objetivo de aumentar a viscosidade das polpas sem chegar ao estado de gelificação.

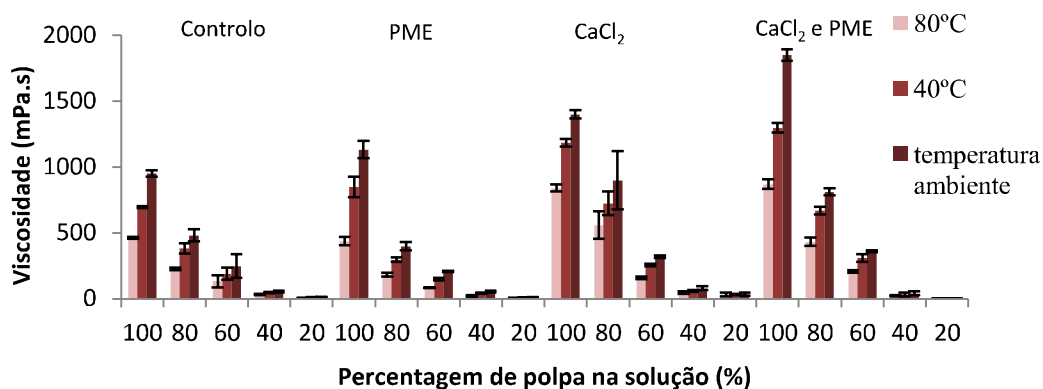


Figura 14 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Morango_1 na ausência e presença de tratamento

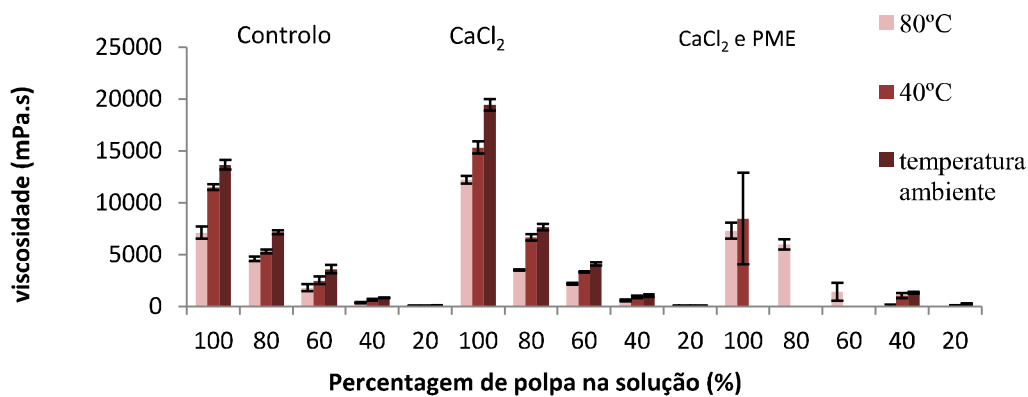


Figura 15 - Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Morango_5 na ausência e presença de tratamento

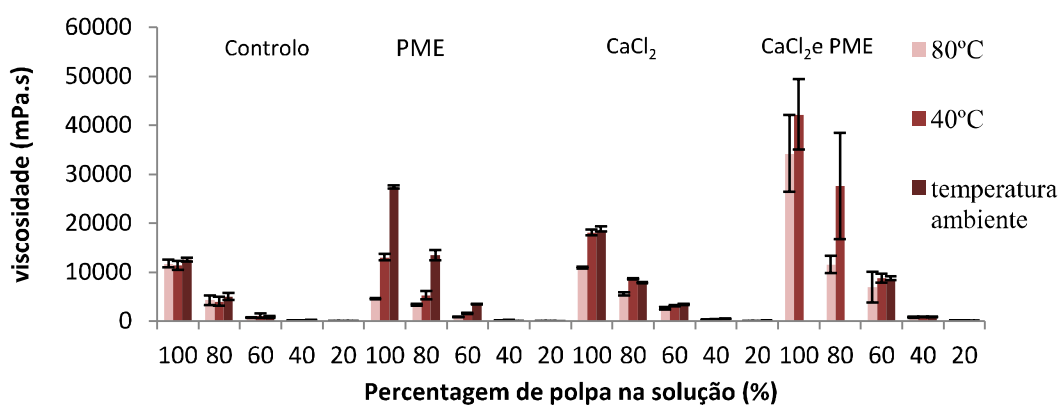


Figura 16 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Maçã na ausência e presença de tratamento

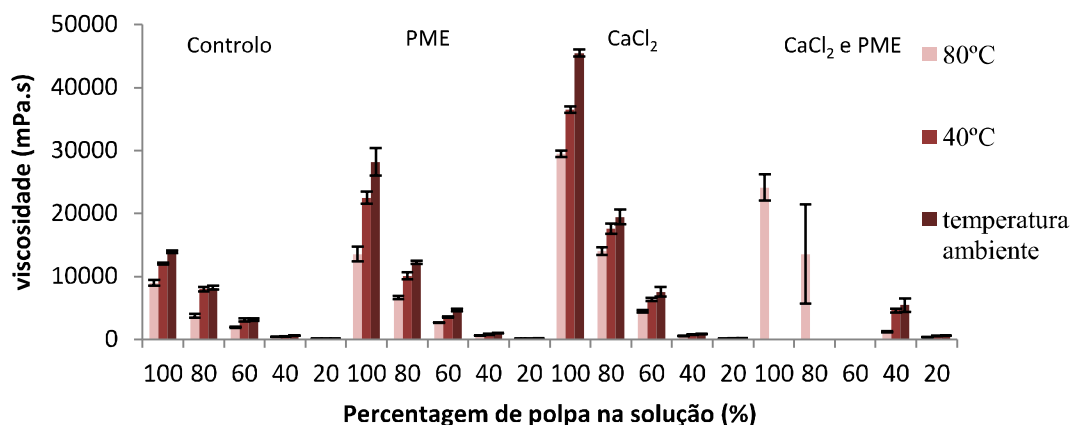


Figura 17 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Manga na ausência e presença de tratamento

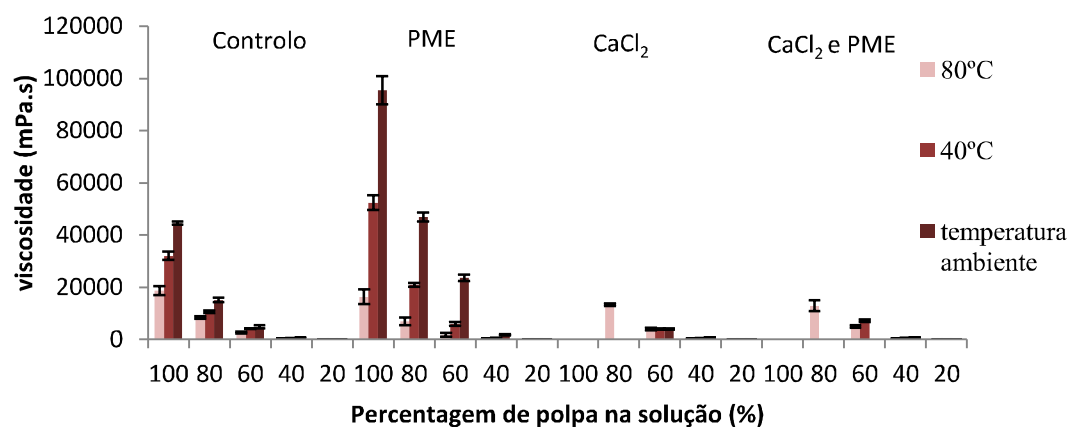


Figura 18 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Marmelo na ausência e presença de tratamento

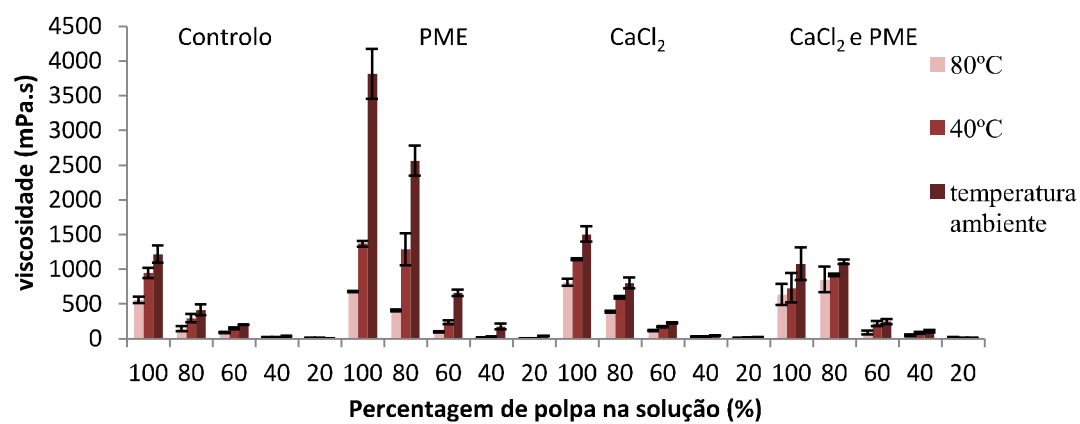


Figura 19 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Mirtilo na ausência e presença de tratamento

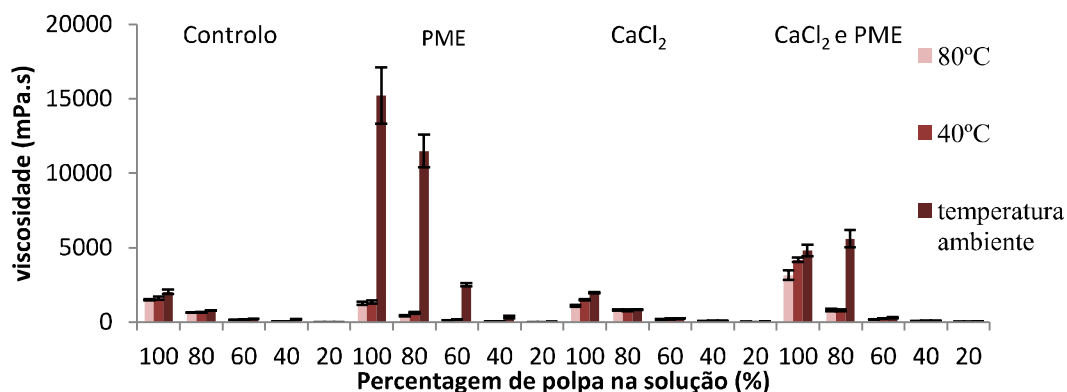


Figura 20 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Limão na ausência e presença de tratamento

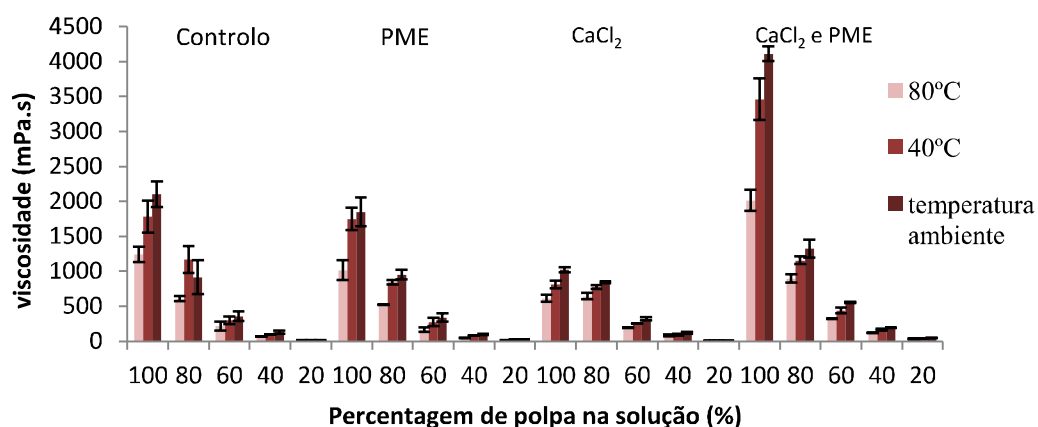


Figura 21 – Apresentação da viscosidade, a três temperaturas, da polpa de Kiwi na ausência e presença de tratamento

5.2.2 Polpas frescas

A caracterização de polpas transformadas a partir de frutos frescos teve como objetivo perceber se havia vantagem na aplicação dos tratamentos para o aumento da viscosidade na presença ou ausência do tratamento térmico às polpas. Os parâmetros físico-químicos, como TSS, pH, análise de açúcares e viscosidade foram avaliados.

O possível cliente da Frulact, interessado no projeto, comercializa o produto final maioritariamente em mercado francês. O morango e o alperce foram escolhidos por serem dos frutos mais consumidos em produtos láteos daquele mercado, apresentando assim um potencial interesse. Foram obtidas polpas através de frutos frescos por estas estarem

sujeitas a menores tratamentos prévios, como a pasteurização. Estas polpas mantinham a atividade endógena de PME e PG quando aplicados os tratamentos para aumentar a viscosidade. Além disto, foram mantidos alguns aspetos sensoriais como o aroma, sabor e cor, dado que estes são degradados quando sujeitos ao aumento de tratamentos térmicos.

5.2.2.1 Teor de sólidos solúveis e pH

A polpa de morango pasteurizada e não pasteurizada não revelaram muitas diferenças entre si em relação aos valores do TSS e pH (**Tabela 23**).

O TSS apresenta valores de 5,0 a 6,5 °Brix, sendo que a polpa pasteurizada apresenta um ligeiro aumento deste parâmetro. A adição de CaCl_2 promove um aumento quer na polpa pasteurizada quer na não pasteurizada do TSS, resultado da solubilidade do CaCl_2 na polpa. No tratamento com o CaCl_2 na presença de PME verifica-se uma tendência da diminuição do TSS em relação ao tratamento apenas com o CaCl_2 . Isto resulta da associação entre os iões cálcio e os grupos carboxílicos desesterificados pela PME, diminuindo a sua concentração na solução. No caso da polpa de morango, a desesterificação provoca um aumento de $\approx 0,2\text{g}$ de iões cálcio complexados.

Entre cada tipo de polpa, o pH entre os diferentes tratamentos situa-se entre 3,00 e 3,60, sendo a polpa sem tratamento a que apresenta o maior valor. A adição de CaCl_2 na presença ou ausência de PME torna a polpa mais ácida. Devido ao pKa dos polissacarídeos pécticos ser $\approx 3,5$, permite a dissociação dos grupos carboxílicos, aumentando a sua eficiência para a complexação. Neste caso, poderá haver uma competição entre os grupos H^+ e os iões Ca^{2+} adicionados em excesso. Os iões cálcio poderão complexar-se com os ácidos pécticos e diminuir o pH pela presença de maior concentração de H^+ em solução.

Tabela 23 – Parâmetros de pH e °Brix para a polpa de morango pasteurizada e não pasteurizada quando sujeita aos diferentes tratamentos.

	Polpa Pasteurizada		Polpa não Pasteurizada	
	pH	TSS (°Brix)	pH	TSS (°Brix)
Sem tratamento	3,56± 0,01	5,4±0,1	3,52±0,01	5,2±0,1
CaCl_2	3,13± 0,01	6,6± 0,1	3,12±0,02	6,2±0,1
PME	3,43±0,02	5,4±0,1	3,52± 0,01	5,2± 0,1
CaCl_2 + PME	3,07±0,01	6,4± 0,2	3,03±0,02	6,0±0,0

Relativamente à polpa de alperce (**Tabela 24**), os valores de pH situam-se entre 2,70 e 3,22 para as polpas que sofreram ou não o tratamento de pasteurização. Como descrito na polpa de morango, a adição de CaCl_2 promove uma diminuição ligeira do pH, quer na presença ou ausência da PME. O TSS encontra-se entre 7,9 e 10,2 °Brix, sendo a polpa pasteurizada a que apresenta os valores mais elevados. Em ambos os tipos de polpas de alperce a adição de CaCl_2 na presença da PME permitiu uma diminuição do TSS em relação ao tratamento apenas com o CaCl_2 . Verifica-se que a desesterificação pela enzima provoca uma associação dos iões cálcio com os polissacarídeos pécticos, diminuindo cerca de 0,2 g do ião cálcio presente em solução.

Tabela 24 - Parâmetros de pH e °Brix para a polpa de alperce pasteurizada e não pasteurizada quando sujeita aos diferentes tratamentos.

	Polpa Pasteurizada		Polpa não Pasteurizada	
	pH	TSS (°Brix)	pH	TSS (°Brix)
Sem tratamento	3,20±0,01	9,5±0,4	3,21±0,03	7,9±0,1
CaCl_2	2,75±0,01	10,2±0,0	2,85±0,01	8,9±0,2
PME	3,06±0,01	9,2±0,1	3,23±0,01	8,0±0,0
CaCl_2 + PME	2,75±0,01	10,0±0,1	2,71±0,04	8,8±0,0

5.2.2.2 Análise de Açúcares

As duas polpas frescas foram caracterizadas quanto ao material polimérico obtido pelos AIR, tendo sido realizada uma análise de açúcares neutros e ácidos urónicos. Os resultados encontram-se na **Tabela 25**.

Tabela 25 - Composição de açúcares dos AIR das polpas de frutos frescos

Amostra	Rendimento	Composição em açúcares (% molar)								Açúcares
	AIR* (g/kg)	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Á.Ur.	Totais (mg/g)
Alperce (fresco)	24	1 ± 0	1 ± 0	18 ± 0	6 ± 0	3 ± 0	7 ± 0	32 ± 1	32 ± 2	982 ± 22
Morango (fresco)	15	2	1	6	12	3	12	39	24	793

O rendimento do AIR pela polpa de alperce (2,4%) foi maior em relação à polpa de morango (1,5%). Relativamente aos açúcares totais, verifica-se que a polpa de alperce apresenta perto de 100% de material polimérico no AIR, estando a polpa de morango com um valor ligeiramente mais baixo (793 mg/g). Relativamente à composição de açúcares, verifica-se que a polpa de alperce apresenta maior percentagem molar de ácidos urónicos que a polpa de morango, sugerindo a presença de uma maior quantidade de polissacarídeos pécnicos [14, 77, 79]. A polpa de Alperce apresenta uma composição de açúcares semelhante à encontrada na bibliografia para a espécie *Prunus armeniaca*, sendo a maior diferença encontrada no resíduo de galactose [99, 100]. Este resíduo apresenta-se em menor quantidade na polpa aqui estudada. Contudo, a polpa de alperce apresenta uma percentagem molar elevada do resíduo de arabinose, propondo uma elevada ramificação dos polissacarídeos pécnicos. De acordo com o descrito por Legentil A., *et al*, a polpa de morango fresca apresenta uma menor quantidade de ácidos urónicos, inferindo uma menor presença de polissacarídeos pécnicos [83].

5.2.2.3 Viscosidade

As polpas de morango e alperce obtidas por pedaços de fruta fresca congelada foram caracterizadas quanto à sua viscosidade. Na **Tabela 26** são apresentados os valores do parâmetro viscosidade para ambas as polpas e a respetiva análise estatística. Pela análise da tabela pode-se concluir que existem diferenças significativas entre o fator tratamento para ambos os frutos, uma vez que apresentam *p-value* <0,001, sendo o tratamento com a enzima PME o mais eficaz no aumento da viscosidade. Relativamente ao tipo de polpa, o programa utilizado para a análise estatística não a consegue realizar, isto porque o número de grupos, neste caso, é inferior a 3. Em ambas as polpas verifica-se que existe influência entre os dois fatores fixos, ou seja, entre o tipo de tratamento e o tipo de polpa, uma vez que é apresentado um *p-value* <0,001. Desta forma, foi realizada uma separação de médias dentro de cada fator através do teste Duncan a $\alpha=0,05$, tendo-se fixado o tipo de polpa e variado o tipo de tratamento.

Tabela 26 – Apresentação dos valores da viscosidade (média±desvio padrão) em função do tipo de tratamento, tipo de polpa e respetiva análise estatística

Fatores	Viscosidade (mPa.s)	
	Morango	Alperce
Tratamento	Controlo	3814±320 ^b
	CaCl ₂	13233±1185 ^b
	PME	11980±1662 ^c
	CaCl ₂ + PME	19107±1746 ^a
Tipo de Polpa	Não Pasteurizada	*
	Pasteurizada	*
O SPSS não realiza esta análise porque o número de grupos é inferior a 3		
Significância	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
	Tratamento	<0,001
	Tipo de Polpa	0,037
	Tratamento x Tipo de Polpa	<0,001

*Não são apresentados resultados porque a polpa gelificou com este tratamento

Nota: Para cada fator, letras diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes ($\alpha < 0,05$)

a – média de valores mais elevada e e - média de valores mais baixa

Relativamente ao estudo da polpa de morango, pelos resultados de separação de médias, verifica-se que ao fixar o tipo de polpa pasteurizada os vários tratamentos usados não são significativamente diferentes, uma vez que apresentam um *p-value* de 0,109 ($>0,05$). Em relação à polpa não pasteurizada, verifica-se que o *p-value* era inferior ao nível de significância definido (0,05) e desta forma existem diferenças significativas entre os tratamentos aplicados à polpa de morango (**Figura 22**). O tratamento que confere uma maior viscosidade à polpa de morango é a ação da enzima PME na presença da polpa não pasteurizada, sendo a viscosidade da polpa pasteurizada com este tratamento semelhante à do controlo. Verifica-se que o tratamento térmico à polpa de morango alterou as suas propriedades funcionais, podendo o aquecimento inicial até aos 95°C ter promovido a degradação dos polissacarídeos pécticos. O pH da polpa de morango ao situar-se perto dos 3,5 pode explicar uma reação de despolimerização nas pectinas por uma reação de β -eliminação. Apesar de esta reação ocorrer na presença de pH um pouco mais alto ($>4,5$), a temperatura de pasteurização e o grau de metil-esterificação elevados fazem com que a β -eliminação seja favorecida. Com a despolimerização das pectinas ocorre a fragmentação destes polissacarídeos, aumentando a sua solubilidade [101, 102]. Foi observado por Colin-Henrion; *et al*, através do tratamento térmico da maçã, uma fragmentação e perda de polímeros contendo ramnose e arabinose, promovendo a solubilização dos polissacarídeos

pécticos com baixo peso molecular [101]. Uma reação de despolimerização por hidrólise ácida também poderá ocorrer, mesmo sendo num baixo rendimento. Esta hidrólise é favorecida com pH ácido, perto de 3, e pela presença de alguns resíduos de ácido galacturónico desesterificados. Uma ligeira desesterificação pela atividade da PME presente na polpa de morango também poderá ocorrer no início do tratamento térmico, podendo promover a hidrólise ácida [101, 103]. A viscosidade da polpa não pasteurizada aumentou com o tratamento da PME. Esta enzima permitiu a desesterificação dos grupos carboxílicos presentes nos polissacarídeos pécticos. Estes, ao encontrarem-se ionizados, associaram-se com os iões cálcio presentes endogenamente no morango, formando zonas de junção iónicas entre as cadeias de polissacarídeos pécticos próximas entre si [9, 28, 104]. De forma a perceber qual a quantidade de cálcio endógena que permitiu o aumento de viscosidade da polpa não pasteurizada, foi determinado, por um laboratório independente, o conteúdo de iões cálcio presente neste lote de morango, sendo o resultado obtido de 162 mg/kg, próximo do encontrado na bibliografia (160 mg/kg). A quantidade de iões cálcio adicionada no tratamento da PME na presença de CaCl_2 foi de ≈ 3600 mg/kg. Comparando este valor adicionado com a quantidade de cálcio presente na própria polpa constata-se que foi aplicada uma quantia bastante superior para atingir níveis de viscosidade desejados sem chegar à gelificação da polpa. Uma diminuição da quantidade de cálcio adicionada poderá favorecer o aumento da viscosidade da polpa inibindo a sua gelificação.

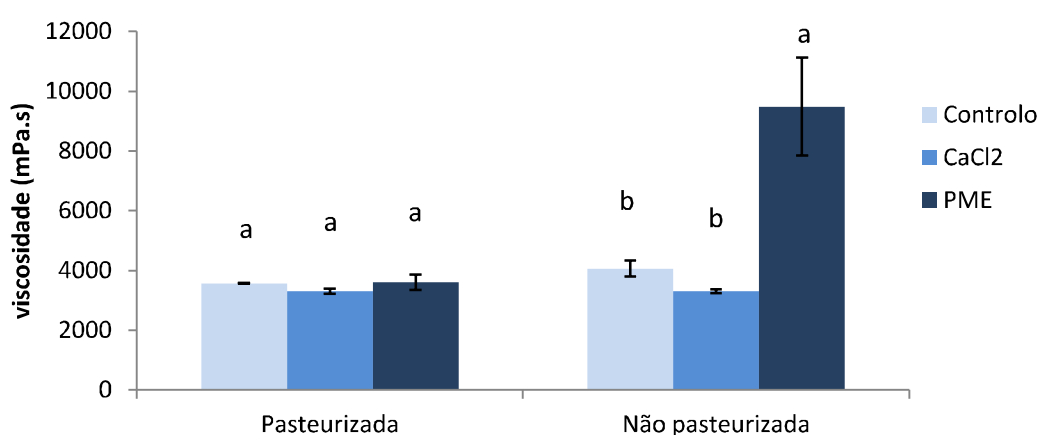


Figura 22 – Apresentação da viscosidade da polpa de morango pasteurizada e não pasteurizada na presença dos tratamentos e respetiva análise estatística. (Nota: O tratamento com o CaCl_2 na presença de PME provocou a gelificação da polpa pasteurizada e não pasteurizada, por este motivo o resultado de viscosidade não está apresentado.)

Relativamente à polpa de alperce, pela separação de médias constata-se que ao fixar o tipo de polpa existem diferenças significativas entre as médias de viscosidade obtidas pelo controlo e pelos tratamentos, uma vez que se obtiveram valores de *p-value* <0,001 (**Figura 23**). Verifica-se que para a polpa de alperce pasteurizada e não pasteurizada o tratamento mais vantajoso foi a aplicação da enzima PME, sendo que para ambos os casos a adição da enzima na presença do CaCl_2 provocou a gelificação da polpa.

Pela análise da **Figura 23**, constata-se que a polpa pasteurizada apresenta um valor mais elevado de viscosidade, para o tratamento com a PME, em relação à polpa não pasteurizada. Apesar destes resultados, verificou-se que a polpa não pasteurizada ficou demasiado consistente, dificultando a leitura pelo viscosímetro. De forma a confirmar que a polpa não pasteurizada apresentava uma maior viscosidade que a polpa pasteurizada, ambas com o tratamento da PME, foi realizado um ensaio com o consistómetro de *Bostwick*. Com este estudo da consistência foi obtido, à temperatura ambiente, um escoamento de $2,75 \pm 0,75$ cm/60s para a polpa pasteurizada e de $0,25 \pm 0,0$ cm/60s para a polpa não pasteurizada, confirmando que este tipo de polpa contém moléculas que promovem uma maior resistência ao escoamento. Por este motivo, para os ensaios seguintes decidiu-se aplicar a polpa não pasteurizada com o tratamento da PME. A quantidade de iões cálcio presente endogenamente no lote de alperce foi determinada. O resultado obtido pelo laboratório independente mostrou que continha 178 mg/kg, acima do valor encontrado na bibliografia (130 mg/kg). Com esta quantidade de cálcio presente na polpa de alperce foi possível atingir uma viscosidade na ordem dos 20000 mPa.s, sendo a quantidade de cálcio adicionada (3600 mg/kg) responsável pela gelificação da polpa no tratamento da PME na presença de CaCl_2 .

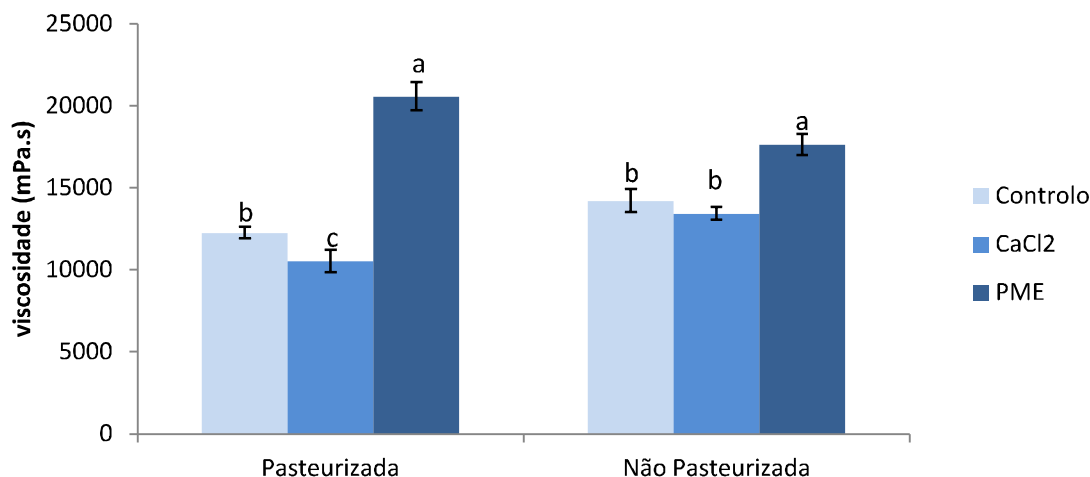


Figura 23 - Apresentação da viscosidade, à temperatura ambiente, da polpa de alperce pasteurizada e não pasteurizada na presença dos tratamentos e respetiva análise estatística. (Nota: O tratamento com o CaCl₂ na presença de PME provocou a gelificação da polpa pasteurizada e não pasteurizada, por este motivo o resultado de viscosidade não está apresentado.)

A nível industrial, a utilização da polpa de morango ou alperce não pasteurizada é mais vantajosa porque melhora a rapidez do processo de elaboração de um produto, não sendo necessário a realização de mais um processo de pasteurização. Além disto, o eventual armazenamento da polpa após o tratamento térmico acarreta sempre gastos energéticos.

5.3 Otimização da ação da PME na viscosidade das polpas

Com a possibilidade de se fazer um teste industrial, tinha-se como objetivo perceber se era possível garantir o aumento da viscosidade das polpas quando se passava da escala laboratorial para a industrial. Dado que laboratorialmente as condições efetuadas para cada ensaio são mais controladas do que industrialmente, estudou-se a ação da enzima PME durante um intervalo de tempo e temperatura. Como nos ensaios anteriores tínhamos com referência os 30 minutos a 40°C no tempo de incubação, pretendeu-se saber se havia influências na viscosidade quando a enzima ficava a incubar numa gama de temperaturas de 30, 40 e 50°C e num intervalo de tempo de 30, 40, 50 e 60 minutos. Os intervalos de tempo e temperatura estudados prendem-se principalmente com a incerteza de manutenção

de tempos e temperaturas no pré-mix da linha de produção, onde é efetuado o tratamento de forma industrial.

A análise estatística efetuada aos resultados da viscosidade das polpas de morango e alperce, sob a influência do tempo e temperaturas de incubação da enzima PME, encontra-se na **Tabela 27**. Pode-se verificar que a significância do fator tempo para ambas as polpas estudadas é $<0,001$, quer isto dizer que existem diferenças significativas entre os vários tempos estudados. A polpa de morango mostrou uma maior viscosidade quando a enzima atuou durante 60 minutos, enquanto a polpa de alperce não mostrou diferenças significativas para os tempos de 40 a 60 minutos, sendo a viscosidade maior nestes tempos em relação ao tratamento apenas com 30 minutos. Em relação ao fator temperatura, a polpa de morango apresenta diferenças significativas entre as várias temperaturas estudadas. No entanto, tal não acontece na polpa de alperce uma vez que apresenta um *p-value* de 0,911. A interação entre o tempo e a temperatura é significativa para as duas polpas. Desta forma, foi realizada a separação de médias utilizando o teste de Duncan com $\alpha=0,05$.

Tabela 27 - Viscosidade das polpas em função do tempo e temperatura de incubação com a enzima PME e respetiva análise estatística.

Fatores		Viscosidade (mPa.s)	
		Morango	Alperce
Tempo (min)	30	11589±1906 ^c	16607±4129 ^b
	40	13231±1073 ^b	21193±1296 ^a
	50	14100±991 ^{a,b}	21247±1946 ^a
	60	14409±615 ^a	19120±6589 ^a
Temperatura (°C)	30	12900±2136 ^b	*
	40	13125±1523 ^b	O SPSS não analisa porque o nº de grupos é inferior a 3
	50	13972±807 ^a	
Significância		<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
	Tempo	$<0,001$	$<0,001$
	Temperatura	$<0,037$	0,911
	Tempo x Temperatura	$<0,046$	0,004

Legenda: * Ensaio não realizado para a polpa de alperce

Nota: Para cada fator, letras diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes ($\alpha<0,05$)

a – média de valores mais elevada e e - média de valores mais baixa

A separação de médias, relativamente à polpa de morango, foi realizada fixando o fator tempo e variando a temperatura, encontrando-se o resultado final na **Figura 24**. Pode-se verificar que ao fixar o tempo não existem diferenças significativas entre os valores da viscosidade para cada temperatura definida, com exceção do tempo de 30 minutos, uma vez que se obteve um $p\text{-value} < 0,05$. Sendo assim, constata-se que para os tempos de 40, 50 e 60 minutos a viscosidade não é significativamente diferente para a gama de temperaturas estudada. Uma vez que a viscosidade é máxima aos 60 minutos, optou-se por este tempo para o teste industrial, podendo a temperatura oscilar de 30 a 50°C. Laboratorialmente, para os próximos ensaios de incubação com a enzima PME na polpa de morango fixou-se a temperatura de 40°C e o tempo de 60 minutos.

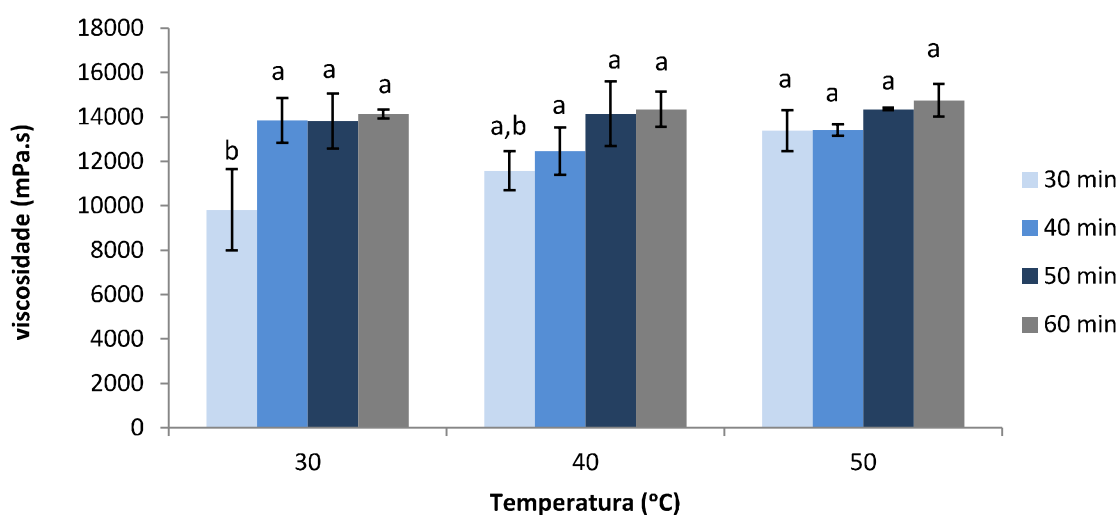


Figura 24 - Viscosidade da polpa de morango, à temperatura ambiente, em função do tempo e temperatura de incubação com a enzima PME, respetiva análise estatística associada

No caso da polpa de alperce, como só foram realizados dois ensaios de temperatura, não foi possível obter a separação de médias pelo *software* fixando o tempo e variando a temperatura. Desta forma, foi realizada a separação de médias pelo teste de Duncan, fazendo variar o tempo e fixando o fator temperatura. O resultado obtido encontra-se na **Figura 25** e pode-se concluir pela análise estatística que na temperatura de 40°C não existem diferenças significativas entre a variação de tempo estudada, uma vez que foi obtido um $p\text{-value} = 0,32 > 0,05$. Em relação à temperatura de 50°C já houve diferenças estatisticamente significativas entre os níveis do fator tempo, sendo o tempo de 30 minutos o que apresenta uma viscosidade de polpa inferior. No entanto, como este ensaio apresenta

uma variabilidade grande constata-se que o experimento não foi bem controlado. Com a exceção deste ensaio, verifica-se pela análise estatística que não houve diferenças significativas no parâmetro viscosidade para as duas temperaturas estudadas. Assim, optou-se por aplicar nos ensaios seguintes, para a polpa de alperce, o mesmo tempo e temperaturas de incubação utilizados nos ensaios anteriores, ou seja, 30 minutos a 40°C.

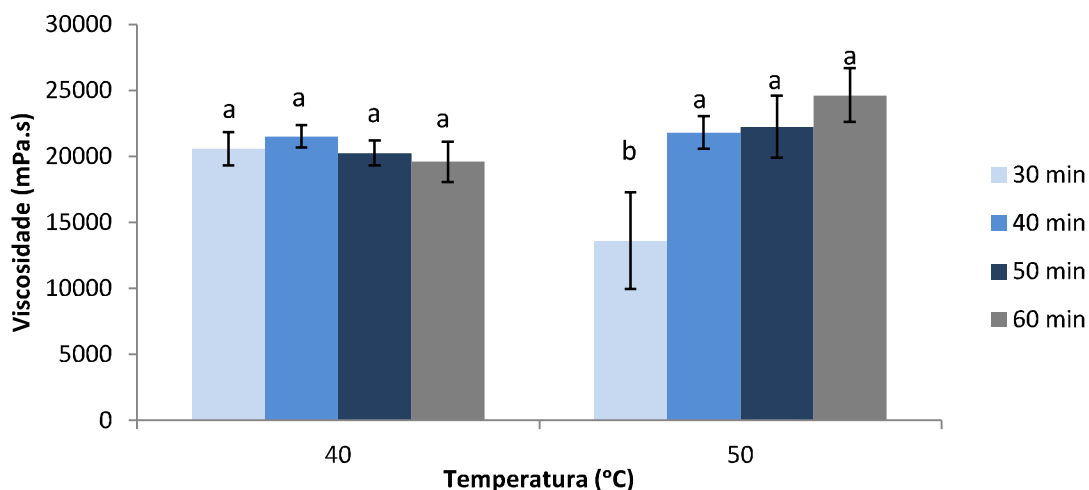


Figura 25 - Resultados da viscosidade da polpa de alperce, à temperatura ambiente, em função do tempo e temperatura de incubação com a enzima PME, respetiva análise estatística associada

5.4 Avaliação da capacidade de suspensão de pedaços

A elaboração de um preparado de fruta apresenta normalmente na sua formulação uma percentagem referente à polpa de fruto. Uma vez que esta percentagem é variável de preparado para preparado, este ensaio teve como objectivo avaliar a concentração de polpa mínima capaz de suspender pedaços de morango, e se os tratamentos aplicados proporcionavam alguma vantagem quando adicionados às polpas. Na **Tabela 28** estão representados os resultados, de uma forma qualitativa, da capacidade de suspensão de pedaços para cada polpa comercial na presença ou ausência de tratamento.

Numa concentração de 100% de polpa, todos os frutos estudados apresentam uma estabilidade máxima dos pedaços na presença ou ausência de tratamentos. Contudo, a polpa controlo de morango_1 apresentou sinerese ao fim de 5 dias. A polpa de Mirtilo não apresenta os resultados do controlo uma vez que a olho nu a visualização dos pedaços não foi possível devido à cor da polpa ser escura. No entanto, para os resultados na presença dos tratamentos foi utilizada a luz *flash* para a visualização dos pedaços.

As polpas de Morango_5, Manga, Maçã, Marmelo e Kiwi apresentam estabilidade de pedaços elevada na diluição de 80% de polpa. A esta concentração a polpa de Morango_1 revela vantagens na utilização dos tratamentos, uma vez que no controlo a estabilidade é reduzida. No Mirtilo e Limão, o tratamento com o CaCl_2 é o único em que a estabilidade de pedaços não é elevada, sendo apenas moderada. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos para o aumento da viscosidade das duas polpas.

Na suspensão com 60% de polpa apenas três das polpas comerciais (Morango_5, manga e Marmelo) apresentam a estabilidade dos pedaços de morango elevada quer no controlo como na presença de tratamentos. No entanto, na polpa de Morango_5 o controlo é o mais estável, dado que os tratamentos efetuados apresentaram sinerese. Este resultado poderá ter aparecido devido a um excesso de iões cálcio não necessário para a dimerização entre os polissacarídeos pécticos, resultando num rearranjo irregular entre os iões cálcio e as cadeias dos polissacarídeos pécticos. Com o passar do tempo algumas zonas de junção poderão sofrer alguma contração promovendo a libertação de água [9, 44]. Esta separação de fases também ocorreu, ao fim dos 5 dias de ensaio, no tratamento com o CaCl_2 + PME na polpa de Manga. Na polpa de Marmelo, apesar da estabilidade elevada, apenas o tratamento com a PME é que não apresenta sinerese, revelando-se como o mais vantajoso. A polpa de Maçã revela interesse na aplicação dos três tratamentos em relação ao controlo, uma vez que este apenas apresenta uma estabilidade de pedaços moderada. Em relação à polpa de Kiwi, o tratamento com CaCl_2 na presença ou ausência de PME mostra estabilidade elevada de pedaços em comparação com o controlo. No entanto, ocorre a presença de sinerese no final dos 5 dias. A polpa de Limão apresenta a suspensão de pedaços elevada nos tratamentos com a PME na presença e ausência de CaCl_2 . Na polpa de Mirtilo e Morango_1 nenhum dos tratamentos mostra interesse para uma estabilidade de pedaços elevada.

Na concentração de 40% de polpa, a polpa de Morango_5, apesar de apresentar uma estabilidade de pedaços elevada no controlo e no tratamento de CaCl_2 + PME, apresenta sinerese ao fim de 5 dias. Na polpa de Manga, os tratamentos apresentam vantagem em relação ao controlo. No entanto, apenas na presença de CaCl_2 é que a suspensão não apresenta sinerese, revelando-se como o tratamento mais promissor. O tratamento com o CaCl_2 + PME foi o único que revelou uma estabilidade de pedaços elevada na polpa de maçã na concentração de 40%. Estes resultados, da polpa de manga e

maçã, coincidem com os dados obtidos no ensaio para o aumento da viscosidade. As restantes polpas comerciais não apresentaram vantagem para a suspensão elevada dos pedaços, na presença ou ausência de tratamentos. Na concentração de 20% de polpa não houve estabilidade elevada de pedaços para nenhuma das polpas, durante os 5 dias do ensaio.

Tabela 28 - Comparação da suspensão de pedaços de morango, ao fim de 5 dias, na presença ou ausência dos diferentes tratamentos nas polpas comerciais

Concentração de polpa (%)																				
100				80				60				40				20				
	Contr.	PME	CaCl ₂	CaCl ₂ + PME	Contr.	PME	CaCl ₂	CaCl ₂ + PME	Contr.	PME	CaCl ₂	CaCl ₂ + PME	Contr.	PME	CaCl ₂	CaCl ₂ + PME	Contr.	PME	CaCl ₂	CaCl ₂ + PME
Morango_1	++ S	++	++	++	- S	++	++	++	- S	+S	+ S	+ S	- S	- S	- S	- S	- S	- S	- S	- S
Morango_5	++	n.e.	++	++	++	n.e.	++	++	++	n.e.	++ S	++ S	++ S	++ S	n.e.	- S	++ S	- S	n.e.	+ S
Manga	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++ S	++ S	++ S	++	++ S	- S	- S	+ S
Maçã	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+ S	+ S	+ S	++	- S	- S	+ S
Marmelo	++	++	++	++	++	++	++ S	++	++ S	++	++ S	++ S	++ S	++ S	+ S	+ S	- S	- S	- S	- S
Mirtilo	n.v	++	++	++	n.v	++	+ S	++	n.v	+S	- S	- S	- S	n.v	- S	- S	- S	n.v	- S	- S
Kiwi	++	++	++	++	++	++	++	++	+S	+S	++ S	++ S	++ S	- S	- S	- S	+ S	- S	- S	- S
Limão	++	++	++	++	+	++	+	++	+ S	++	- S	++	++	- S	- S	- S	- S	- S	- S	- S

Legenda: (++) estabilidade de pedaços elevada
 (+) estabilidade de pedaços moderada (pedaços desceram entre 0 a 5mm)
 (-) estabilidade de pedaços reduzida (pedaços desceram mais de 5mm)
 (S) ocorrência de sinerese
 (n.e.) ensaio não efectuado
 (n.v.) a visualização dos pedaços não foi possível devido ao mirtilo apresentar uma cor escura

5.5 Desenvolvimento de preparados à base de fruta

Com o objetivo de aplicar as polpas de morango e alperce funcionalizadas, sujeitas ao aumento da sua viscosidade com o tratamento da PME, foram desenvolvidos preparados à base de fruta. Pretendia-se saber se a sua aplicação era eficaz, no sentido em que fornecia uma consistência e viscosidade final desejada para cada tipo de preparado, evitando o uso de alguns aditivos com funções espessantes ou estabilizantes. Contudo, caso a sua utilização fosse necessária para garantir os parâmetros finais do preparado, que fosse apenas adicionada numa quantidade reduzida na fórmula.

5.5.1 Preparados de polpa

No desenvolvimento de preparados de polpa foi possível avaliar dois aspetos diferentes. No primeiro ponto introduziu-se a polpa diretamente como ingrediente num preparado à base de fruta, após o tratamento com a PME, estando sujeita apenas a uma 1ª transformação industrial. No segundo ponto avaliou-se se a polpa, quando inserida no preparado, mantinha as mesmas características quando sujeita a pasteurização após o tratamento enzimático, neste caso haveria uma 2ª transformação industrial. Além deste aspeto, verificou-se o comportamento da utilização do açúcar e dos edulcorantes para a consistência final de cada preparado.

5.5.1.1 Morango – Açucarados

Na **Tabela 29** são apresentados os resultados finais do preparado industrial açucarado com e sem a adição de amido. Relativamente ao TSS, verifica-se que o preparado industrial (40,5 °Brix) apresenta um valor superior com a adição do amido. Este resultado poderá ser explicado por uma hidrólise ácida do amido. Em condições ácidas (pH=2-5) e a elevadas temperaturas (75-95°C) os iões de hidrogénio podem quebrar as ligações entre as moléculas de glucose que constituem o amido [105, 106]. Desta forma, como o preparado apresenta um pH de 3,75 e sofreu uma pasteurização a 90°C poderá ter aumentado a solubilidade de algumas moléculas de glucose, aumentando o TSS presente no preparado de fruta. A utilização do amido como aditivo apresenta vantagens uma vez que funciona como espessante, influenciando a textura e aparência do preparado [8]. Deste

modo, comparando os resultados obtidos do índice de Bostwick e da viscosidade, pode-se verificar que o amido quando adicionado alterou consideravelmente estes valores. A sua aplicação ao preparado industrial aumentou a viscosidade de 780 para 15240 mPa.s e diminuiu o índice de Bostwick de 23,5 para 8,5 cm/60s, ou seja, aumentou a resistência de escoamento do preparado. O pH de ambos os preparados não apresenta diferenças significativas.

Tabela 29 - Resultados dos parâmetros do preparado industrial açucarado com e sem a adição de amido

Parâmetros	Preparado industrial	Preparado industrial s/ amido
TSS (°Brix)	40,5	36,2
pH	3,75	3,72
Índice de Bostwick (cm/60s)	8,5	23,5
Viscosidade (mPa.s)	15240	780

Tabela 30 - Resultados finais dos preparados de fruta açucarados de morango com polpa pasteurizada e não pasteurizada após o tratamento com PME

Parâmetros	Polpa não pasteurizada				
	PadrãoM_NP	PMA_NP1	PMA_NP2	PMA_NP3	PMA_NP4
TSS (°Brix)	38,8	36,8	37,3	37,5	40,8
pH	3,79	3,75	3,72	3,74	3,71
Índice de Bostwick (cm/60s)	19,75	13	10,75	9,75	3,5
Viscosidade (mPa.s)	1042	3728	4848	5616	34160
	Polpa pasteurizada				
	PadrãoM_P	PMA_P1	PMA_P2	PMA_P3	PMA_P4
TSS (°Brix)	37,6	37,7	37,4	38	38,3
pH	3,73	3,74	3,76	3,76	3,73
Índice de Bostwick (cm/60s)	22	19,75	18,75	17,25	8,75
Viscosidade (mPa.s)	512	808	1066	2232	11060

Foi avaliada a utilização da polpa não pasteurizada e pasteurizada após o tratamento com a PME em preparados de fruta, dado que este tratamento foi o mais promissor nas duas polpas frescas. Pela análise do pH (**Tabela 30**) pode-se concluir que os preparados com polpa pasteurizada (pH=3,71-3,73) e não pasteurizada (pH=3,71-3,79) apresentaram valores muito próximos aos preparados industriais com e sem amido (pH de 3,75 e 3,72, respetivamente) (**Tabela 29**). Os valores do TSS, para todos os preparados, variou entre

37,6 e 40,8 °Brix, encontrando-se dentro dos valores obtidos para a polpa industrial com e sem amido, 40,5 e 36,2 °Brix, respectivamente. O preparado padrão com polpa não pasteurizada (PadrãoM_NP) conferiu uma maior viscosidade e um índice de Bostwick mais baixo em relação ao preparado industrial sem amido. Pode-se concluir que a polpa não pasteurizada apresentou uma viscosidade mais elevada, mesmo sem o tratamento enzimático, em relação ao concentrado de morango. Quando aplicada a polpa não pasteurizada com o tratamento enzimático (PMA_NP1), a viscosidade em relação ao respectivo padrão (PadrãoM_NP) aumentou de 1042 para 3728 mPa.s, permitindo inferir que existe vantagem na incorporação desta polpa em preparados à base de fruta. O preparado PMA_NP2, com 20% do amido da fórmula industrial, conferiu um índice de Bostwick de 10,75 cm/60s, ou seja, muito próximo do mesmo parâmetro medido no preparado industrial. Dado que este tipo de aparelho apresenta um erro de ± 2 cm por leitura, ambos os preparados são ligeiramente iguais no parâmetro da consistência. O preparado PMA_NP3, com 40% de amido da fórmula original, conseguiu aproximar-se ainda mais da consistência desejada, tendo obtido 9,75 cm/60s. A utilização de 100% do amido proporcionou ao preparado PMA_NP4 um índice de Bostwick demasiado baixo (3,5 cm/60s), o que se reflete também na viscosidade final. Com estes resultados, pode-se concluir que a adição de apenas 20 a 40% de amido em relação à fórmula industrial confere um índice de Bostwick muito próximo do desejado. O uso da polpa não pasteurizada após o tratamento enzimático diminui entre 80 e 60% a adição de aditivos neste preparado, revelando-se vantajoso.

Em relação ao uso da polpa pasteurizada pode-se verificar que o preparado padrão, sem apresentar tratamento enzimático (PadrãoM_P), revelou uma viscosidade inferior (512 mPa.s) em relação ao preparado industrial sem amido (780 mPa.s) mas, uma consistência muito próxima, isto é, com uma baixa resistência ao escoamento. Os parâmetros de consistência (19,75 cm/60s) e viscosidade (808 mPa.s) do preparado que incorpora a polpa pasteurizada e funcionalizada (PMA_P1) encontram-se longe do objetivo, assim como os preparados que contêm 20 e 40% de amido da fórmula industrial. Apenas o preparado com a incorporação de 100% de amido (PMA_P4) é que apresentou uma consistência próxima do ideal. Sendo assim, conclui-se que a incorporação da polpa pasteurizada após tratamento com PME não apresenta interesse quando aplicada no preparado, sendo

necessária a adição da mesma quantidade de aditivo para se adquirir proximidade nos parâmetros finais.

5.5.1.2 *Morango - Edulcorados*

O objetivo de estudo dos preparados edulcorados passa por perceber se a presença de edulcorantes tem alguma influência na funcionalização pretendida das polpas, verificando se existe uma limitação para o desenvolvimento.

Em relação ao preparado industrial açucarado, o preparado edulcorado contém uma maior percentagem de amido. Isto resulta do facto da percentagem de edulcorantes ser menor para manter o mesmo índice de doçura em relação à percentagem de açúcar do preparado açucarado. Assim, é aplicada uma maior quantidade de água na fórmula edulcorada, sendo necessária a adição de uma percentagem de amido mais elevada para atingir a consistência e a viscosidade aceitáveis para o preparado.

Na **Tabela 31** encontram-se os resultados dos parâmetros obtidos para os preparados industriais edulcorados de morango na presença ou ausência de amido. Verifica-se, tal como no preparado açucarado, que o TSS e a viscosidade aumentaram com a adição do amido como aditivo. Pelo contrário, o índice de Bostwick foi mais baixo no preparado industrial, ou seja, apresentou uma maior resistência ao escoamento. O pH foi idêntico em ambos os preparados.

Na **Tabela 32** estão representados os resultados finais dos preparados edulcorados de morango. Os valores de TSS são inferiores (entre 5,3 e 9,3 °Brix) devido à quantidade de edulcorantes que se adiciona ser menor em relação à percentagem de açúcar na fórmula açucarada. O pH dos preparados encontra-se entre 3,72 e 3,8, idêntico ao desejado. Contrariamente aos preparados açucarados, o preparado padrão (PadrãoE_NP) e o preparado que contém a polpa não pasteurizada após o tratamento enzimático (PME_NP1) apresentaram um índice de Bostwick superior ao preparado industrial sem amido, não tendo apresentado resistência ao escoamento (indicado como líquido). Com a adição de 20% (PME_NP2) e 40% (PME_NP3) do amido da fórmula industrial não foi possível diminuir o índice de Bostwick para o valor que se pretendia atingir (16,25 e 11 cm/60s para o PME_NP2 e PME_NP3, respetivamente). Foi necessário a adição de 100% de

amido da fórmula industrial para chegar ao índice de Bostwick de 5,5 cm/60s, próximo do ideal. Visualizando as viscosidades e os índices de Bostwick dos preparados com polpa pasteurizada verifica-se que ficaram todos aquém dos mesmos parâmetros do preparado industrial edulcorado, com exceção do preparado que contém 100% de amido da fórmula original. Este apresenta um índice de Bostwick de 6,25 cm/60s, apresentando o limite máximo de semelhança com o preparado industrial $4,25 \pm 2$ cm/60s.

Tabela 31 – Resultados dos parâmetros do preparado industrial edulcorado de morango com e sem a adição de amido

Parâmetros	Preparado industrial	Preparado industrial s/ amido
TSS (°Brix)	8,7	6,2
pH	3,75	3,72
Índice de Bostwick (cm/60s)	4,25	21
Viscosidade (mPa.s)	25640	754

Tabela 32 - Resultados finais dos preparados de fruta edulcorado de morango com polpa de morango não pasteurizada e pasteurizada após tratamento com PME

Parâmetros	Polpa não pasteurizada				
	PadrãoE_NP	PME_NP1	PME_NP2	PME_NP3	PME_NP4
TSS (°Brix)	6	5,9	6,3	6,8	9,3
pH	3,8	3,75	3,74	3,74	3,74
Índice de Bostwick (cm/60s)	Líquido	Líquido	16,25	11	5,5
Viscosidade (mPa.s)	1122	1020	2000	5368	27120
	Polpa Pasteurizada				
	PadrãoE_P	PME_P1	PME_P2	PME_P3	PME_P4
TSS (°Brix)	5,3	6,6	6,2	6,1	9,2
pH	3,75	3,72	3,73	3,72	3,72
Índice de Bostwick (cm/60s)	Líquido	Líquido	23,5	16,75	6,25
Viscosidade (mPa.s)	412	508	872	2248	24240

Pode-se concluir que a aplicação da polpa não pasteurizada e pasteurizada após o tratamento com a PME não confere benefícios na substituição do aditivo amido quando inserida num preparado edulcorado, sendo necessário para ambos os casos o uso de 100% do amido usado na fórmula industrial. A capacidade dos edulcorantes para diminuir a atividade da água é menor que a do açúcar, formando uma estrutura do gel menos eficaz [31]. Além disto, a adição de edulcorantes é bastante mais baixa que a quantidade de água presente em cada preparado. Como os edulcorantes são incapazes de se associarem com

toda a água disponível, esta impede a associação entre os grupos carboxílicos desesterificados e os íons cálcio [1, 7]. Um dos edulcorantes adicionados, a frutose, tem ainda a capacidade de competir com os íons cálcio para a associação com as cadeias dos polissacarídeos pécticos, diminuindo a força do gel [31, 44].

5.5.1.3 Alperce – Açucarados

No caso do alperce não se realizaram os preparados industriais. No entanto, foram elaborados preparados com a incorporação da polpa de alperce pasteurizada e não pasteurizada após o tratamento enzimático. Mantendo a mesma gama de preparados açucarados e edulcorados, avaliou-se a aplicação da polpa de alperce pela comparação dos parâmetros finais de cada preparado com os parâmetros dos preparados industriais de morango, descritos nos pontos 4.4.1.1 e 4.4.1.2. O objetivo foi a minimização ou a ausência da adição do aditivo amido.

O TSS de todos os preparados açucarados situou-se entre 36,1 e 39,6 °Brix, valores semelhantes aos encontrados nos preparados industriais do morango com e sem amido, 40,5 e 36,2 °Brix, respetivamente. O valor de pH dos preparados de alperce foi muito idêntico, variando apenas de 3,38 e 3,44. Estes valores encontram-se mais baixos aos obtidos na polpa de morango devido ao pH da polpa de alperce ser inferior. Comparando os dados obtidos na **Tabela 33** pela **Tabela 29** verifica-se que a incorporação da polpa não pasteurizada no preparado padrão (PadrãoA_NP) apresentou viscosidade superior ao preparado industrial sem amido (1560 e 780 mPa.s, respetivamente). O mesmo se confirma com o índice de Bostwick mais baixo, apresentando uma maior resistência ao escoamento. O preparado com polpa não pasteurizada após a ação enzimática (PAA_NP1) apresentou um índice de Bostwick de 9,75cm/60s. Comparando com o preparado industrial, este valor é semelhante a 8,5cm/60s, uma vez que poderá existir um erro de ± 2 cm. Desta forma, é possível através do tratamento da polpa de alperce, elaborar um preparado sem adicionar qualquer aditivo com função de espessante, reduzindo em 100% a sua adição. A incorporação de 20 (PAA_NP2) e 40% (PAA_NP3) de amido diminuiu o índice de Bostwick em 2,05 e 2,75 cm em relação ao preparado PAA_NP1. Apesar desta diminuição, a consistência continua muito semelhante à dos preparados industriais, parecendo não compensar o uso do aditivo.

Em relação ao preparado padrão com a polpa pasteurizada (PadrãoA_P), este apresentou uma viscosidade inferior (514 mPa.s) em relação ao preparado industrial sem amido de morango (780 mPa.s). Como no caso do morango, os preparados que contêm polpa de alperce pasteurizada após o tratamento com PME conferiram uma viscosidade inferior (3760 mPa.s) em relação ao preparado com polpa não pasteurizada (5840 mPa.s). A adição de 20% da quantidade de amido (PAA_P2) parece ser eficaz para o índice de Bostwick passar para 10,5 cm/60s, encontrando-se no limite máximo possível em relação ao valor do preparado industrial de morango (8,5 cm/60s). O preparado que apresenta 40% de amido (PAA_P3) revelou uma viscosidade inferior (10400 mPa.s) ao preparado industrial de morango (15240 mPa.s) mas o índice de Bostwick é próximo. Com a adição de 100% de amido foi possível diminuir a consistência para 5 cm/60s e aumentar a viscosidade final. Pode-se concluir que no caso dos preparados com polpa pasteurizada, a adição de 20% de amido é suficiente para atingir os parâmetros ideais, reduzindo 80% da adição de aditivos.

Tabela 33 - Resultados finais dos preparados de fruta açucarados com polpa de alperce não pasteurizada e pasteurizada após tratamento com PME

Parâmetros	Polpa não pasteurizada				
	PadrãoA_NP	PAA_NP1	PAA_NP2	PAA_NP3	PAA_NP4
TSS (°Brix)	36,8	36,8	37,3	37,4	39,4
pH	3,44	3,38	3,38	3,40	3,39
Índice de Bostwick (cm/60s)	21	9,75	7,5	7	4
Viscosidade (mPa.s)	1560	5840	9200	10400	23440
	Polpa Pasteurizada				
	PadrãoA_P	PAA_P1	PAA_P2	PAA_P3	PAA_P4
TSS (°Brix)	36,1	36,8	36,9	37,2	39,6
pH	3,44	3,41	3,37	3,39	3,42
Índice de Bostwick (cm/60s)	Líquido	13	10,5	8,5	5
Viscosidade (mPa.s)	514	3760	6480	9520	20160

5.5.1.4 Alperce – Edulcorados

Do mesmo modo que os preparados açucarados, compararam-se os parâmetros finais dos preparados edulcorados (**Tabela 34**) com os preparados industriais de morango (**Tabela 31**). A polpa não pasteurizada incorporada no preparado padrão (PadrãoE_NP) conferiu valores de viscosidade superiores (2264 mPa.s) e uma consistência menor (16

cm/60s) em relação à polpa adicionada no preparado industrial de morango (754 mPa.s e 21 cm/60s). A aplicação do tratamento da PME na polpa do preparado PAE_NP1 apresentou cerca do dobro da viscosidade (4624 mPa.s) e metade o valor do índice de Bostwick (8,75 cm/60s) obtidos pelo PadrãoE_NP. No entanto, estes valores ainda estão longe do objetivo, sendo apenas com a introdução de 20% de amido possível atingir o limite máximo para o índice de Bostwick 6,25cm/60s. Os preparados com os 40 (PAE_NP3) e 100% de amido (PAE_NP4) apresentaram um escoamento ainda mais próximo do preparado industrial. Com isto, pode-se reduzir cerca de 80% a adição de amido no preparado de alperce com a aplicação da polpa não pasteurizada após o tratamento, parecendo não influenciar a adição de uma maior quantidade de aditivo.

Em relação à aplicação de polpa pasteurizada no preparado edulcorado (PadrãoE_P), esta não apresentou nenhum benefício nos parâmetros de viscosidade e índice de Bostwick em relação aos do preparado industrial sem amido do morango. A aplicação da polpa pasteurizada sujeita a tratamento prévio com a PME melhorou os parâmetros referidos atrás, contudo estes encontram-se muito afastados do desejado. Apenas a adição de 100% de amido (PAE_P4) é que atingiu o parâmetro do índice de Bostwick de 4,25 cm/60s, sendo o valor de viscosidade bastante mais elevado. A adição de 20 (PAE_P2) e 40% (PAE_P3) de amido não mostrou ser suficiente, estando a viscosidade e a consistência aquém do ideal. A incorporação no preparado edulcorado da polpa pasteurizada após tratamento enzimático não foi capaz de ser suficiente para garantir a diminuição do uso de amido, sendo necessário os 100% da fórmula industrial de morango.

Tabela 34 - Resultados finais dos preparados de fruta edulcorados com polpa de alperce não pasteurizada e pasteurizada após tratamento com PME

Parâmetros	Polpa não pasteurizada				
	PadrãoE_NP	PAE_NP1	PAE_NP2	PAE_NP3	PAE_NP4
TSS (°Brix)	5,4	5,3	5,6	6,8	9,3
pH	3,42	3,43	3,4	3,37	3,44
Índice de Bostwick (cm/60s)	16	8,75	6,25	5,75	4,75
Viscosidade (mPa.s)	2264	4624	10700	16920	32480
	Polpa Pasteurizada				
	PadrãoE_P	PAE_P1	PAE_P2	PAE_P3	PAE_P4
TSS (°Brix)	5,1	5,4	5,7	6,2	9,5
pH	3,46	3,41	3,41	3,42	3,43
Índice de Bostwick (cm/60s)	Líquido	18,5	16	10,5	4,25
Viscosidade (mPa.s)	346	1392	2928	7272	34960

Na indústria alimentar o tratamento de pasteurização é bastante utilizado para reduzir o número de microrganismos e inativar enzimas presentes nas polpas das frutas [103, 107]. Todos os preparados referidos anteriormente, com exceção dos industriais e dos padrões, incorporaram polpa de frutos sujeita ao tratamento enzimático com a PME. No entanto, estudou-se a aplicação direta da polpa após tratamento enzimático em alguns preparados, enquanto noutros a polpa foi adicionada depois de sujeita a um tratamento térmico após o método de enzimagem. Assim, verificou-se que os preparados, em que a polpa sofreu apenas uma pasteurização, mostraram vantagens na viscosidade e na consistência em relação aos preparados em que a polpa sofreu duas pasteurizações (pasteurização da polpa após tratamento e quando adicionada em preparado). Dado que a polpa foi sujeita à desesterificação dos polissacarídeos pécticos pela enzima pectinametilesterase, não seria de esperar que o efeito da pasteurização, a elevadas temperaturas, revela-se resultados diferentes quando aplicada no preparado, uma vez que o gel formado pelos ácidos pécticos é termo-reversível [40, 41, 47]. Apesar da elevada temperatura de pasteurização, a reação de despolimerização por β -eliminação não ocorre com os resíduos de ácido galacturónico desesterificados, esta reação apenas poderá acontecer na possibilidade da ação da enzima PME não estar a desesterificar na sua totalidade os resíduos de ácido galacturónico [64, 108]. Para contrariar este efeito, seria necessário mais tempo de incubação, de forma a ocorrer a desesterificação completa, ou adicionar uma quantidade maior de enzima à polpa. Uma reação de hidrólise ácida também poderá explicar a diminuição do efeito da viscosidade no preparado. Esta reação ocorre a um pH inferior a 3 e na presença de temperaturas elevadas ($> 100^{\circ}\text{C}$). Como a polpa apresenta um valor de pH ligeiramente superior a 3 e uma temperatura de pasteurização próxima dos 100°C , é possível que a hidrólise ácida ocorra, promovendo a despolimerização dos polissacarídeos pécticos através dos resíduos de ácido galacturónico desesterificados [102].

5.5.2 Preparados *FruitOnly*

O objetivo principal deste trabalho foi a elaboração de preparados de fruta com pedaços, adicionando o mínimo de aditivos. A sua aplicação final era em iogurte batido e pretendia-se que a formulação apresentasse um baixo número de ingredientes, sendo o mais *clean label* possível. Tendo em conta os resultados obtidos, optou-se por aplicar a polpa fresca de morango e alperce não pasteurizadas e sujeitas ao tratamento apenas com a

PME. Serão apresentados os resultados das várias formulações, quer para o preparado de pedaços de morango quer para o de alperce. No entanto, o parâmetro de viscosidade para estes preparados não foi realizado porque a leitura ia ser influenciada pelos pedaços existentes nos preparados.

5.5.2.1 Morango

O preparado tipo 1 (**Tabela 35**), fórmula com a adição de aditivos, apresentava na sua constituição uma maior percentagem de pedaços de morango (60%) do que de polpa comercial (20%), sendo esta a proporção que inicialmente se pretendia obter. As formulações desenvolvidas para comparar com este preparado tipo 1 são o Padrão 1 e P_F1 (**Tabela 36**), que apresentaram a polpa de morango sem e funcionalizada com o tratamento da enzima, respetivamente. Entre estes últimos 3 preparados referidos, os valores dos TSS encontram-se muito próximos entre si (25,6-26,4 °Brix), o mesmo acontece com os valores do pH (3,69-3,74). Visualizando o parâmetro do índice de Bostwick do preparado tipo 1 verifica-se que este se encontra nos 7,75 cm/60s, sendo este valor o desejado para as respetivas formulações desenvolvidas. Pela **Tabela 36** pode-se confirmar que o parâmetro referido anteriormente ficou aquém do ideal, dado que o preparado com a polpa de morango funcionalizada apresentava um índice de Bostwick de 12 cm/60s. No entanto, este consegue apresentar uma resistência ao escoamento um pouco mais elevada do que o respetivo padrão. Tendo em consideração os resultados obtidos, foi necessário aumentar a percentagem de polpa incorporada no preparado. Com isto, foi desenvolvida uma nova fórmula de preparado que continha a mesma percentagem de pedaços e polpa de morango (40%), o preparado P_F2. Com o aumento da quantidade de polpa, o preparado P_F2 que continha a polpa funcionalizada com a PME, conseguiu atingir o limite superior do índice de Bostwick (9,75 cm/60s) que se tinha como objetivo. Contudo, desenvolveu-se uma outra formulação para garantir uma maior estabilidade ao preparado. Esta apresentava apenas mais 5% de polpa que a anterior, ou seja, 45% de polpa e a mesma quantidade de pedaços (40%). Através desta nova fórmula, o preparado P_F3 com a polpa funcionalizada, conseguiu atingir um índice de Bostwick de 8 cm/60s, apresentando diferentes características de escoamento em relação ao respetivo padrão (11 cm/60s). Como referência foi realizado um novo preparado tipo 2 com a aplicação de aditivos. Este apresentava as mesmas quantidades de polpa e pedaços de morango que o preparado P_F3.

Sendo assim, já era possível comparar o parâmetro da consistência obtido pelo P_F3 com o do preparado tipo, que continuava a ser 7,75cm/60s. Os outros dois parâmetros medidos, TSS (29,9- 21,1 °Brix) e pH (3,72-3-75), também de se encontravam muito próximos entre si. Pode-se concluir que o objetivo para o preparado de morango foi alcançado. Obteve-se um preparado com apenas 5 ingredientes, sem a adição de aditivos com funções de estabilizantes e espessantes, sendo a fruta representada em 85%.

Tabela 35 – Parâmetros dos preparados tipo realizados para duas formulações diferentes de morango

Parâmetros	Preparado tipo 1 (20:60:18)	Preparado tipo 2 (45:40:13)
TSS (°Brix)	26,4	21,1
pH	3,69	3,72
Índice de Bostwick (cm/60s)	7,75	7,75

Tabela 36 – Parâmetros de todas as formulações realizadas para o preparado de pedaços de morango

Parâmetros	Padrão 1	P_F1	Padrão 2	P_F2	Padrão 3	P_F3
TSS (°Brix)	25,6	26,2	25,7	26	21,1	20,9
pH	3,74	3,74	3,74	3,75	3,75	3,75
Índice de Bostwick (cm/60s)	14,25	12	12,5	9,75	11	8

5.5.2.2 Alperce

Foram desenvolvidas duas formulações diferentes para os preparados de pedaços de alperce. Numa primeira etapa desenvolveu-se a proporção de 20% de polpa e 60% de pedaços de alperce, tendo-se elaborado um preparado tipo 1 na presença de aditivos (**Tabela 37**), um preparado que continha a polpa de alperce sujeita ao tratamento com a enzima (P_F1) e o respetivo padrão com a polpa sem tratamento (Padrão 1) (**Tabela 38**). Os valores de TSS são semelhantes entre os 3 preparados (25,4-27,4 °Brix), enquanto o valor de pH para o preparado tipo 1 (3,50) é ligeiramente superior ao dos preparados Padrão 1 e P_F1 (3,31 e 3,17, respetivamente). Este resultado pode ser explicado pelo facto do concentrado de alperce utilizado não ser tão ácido. O parâmetro do índice de Bostwick do preparado tipo 1 foi de 6,5 cm/60s, sendo este o valor que se pretendia que o preparado P_F1 atingisse. Após a realização deste, foi medida a consistência 24 h depois próximo do ideal, tendo-se obtido 6,25 cm/60s. No entanto, a diferença deste valor em relação ao respetivo padrão, com a polpa de alperce não funcionalizada, não é

considerável, isto porque podem apresentar apenas uma diferença de 0,25 cm de escoamento com um erro de ± 2 cm do aparelho. De forma semelhante aos preparados de pedaços de morango, foram desenvolvidos preparados com a proporção de 45:40:13, representando polpa, pedaços de alperce e açúcar, respetivamente. O valor de TSS do novo preparado tipo 2 (23,3 °Brix) era ligeiramente superior aos restantes preparados (20,1; 20,5; 20,4 °Brix para o Padrão 2, P_F2 e P_F3, respetivamente), assim como o valor de pH, pela mesma razão explicada anteriormente. O preparado tipo 2 (**Tabela 37**), com a presença de aditivos, obteve um índice de Bostwick de 6,25 cm/60s, semelhante ao obtido pelo preparado Padrão 2 com a polpa de alperce não funcionalizada (7,25 cm/60s). Este por si só, apresentava o valor de consistência desejado. Sendo assim, esperava-se que o preparado que incorporou a polpa de alperce sujeita ao tratamento enzimático (P_F2), apresentasse um valor ainda mais baixo. Pela **Tabela 38** pode-se verificar que apenas escoou 2 cm/60s, apresentando uma consistência inferior à ideal e indícios de alguma gelificação. Com isto, optou-se por diminuir o tempo de incubação da polpa com a enzima PME para 20 minutos em vez dos iniciais 30. Desta forma, o tempo de desesterificação dos polissacarídeos pécticos pela enzima era menor, havendo menos associação com os iões cálcio disponíveis endogenamente na polpa de alperce. O índice de Bostwick deste preparado P_F3 (3,25cm/60s), com a ação da PME durante 20 minutos, não aumentou significativamente em relação ao P_F2, no entanto, não exibia um aspeto de gelificação. Apesar deste parâmetro estar inferior ao do ideal, não deixa de ser um resultado interessante, isto porque conseguiu-se com as mesmas percentagens de polpa e pedaços obter um índice de Bostwick inferior ao do preparado que contém a adição de aditivos (preparado tipo 2). Desta forma, o tratamento da polpa de alperce é extremamente eficaz e apresenta vantagens de aplicação em preparados, evitando-se o uso de espessantes e estabilizantes.

Tabela 37 - Parâmetros dos preparados tipo realizados para duas formulações diferentes de alperce

Parâmetros	Preparado tipo 1 (20:60:18)	Preparado tipo 2 (45:40:13)
TSS (°Brix)	27,4	23,3
pH	3,50	3,60
Índice de Bostwick (cm/60s)	6,5	6,25

Tabela 38 - Parâmetros de todas as formulações realizadas para o preparado de pedaços de alperce

Parâmetros	Padrão 1	P_F1	Padrão 2	P_F2	P_F3
TSS (°Brix)	25,4	27,2	20,1	20,5	20,4
pH	3,31	3,17	3,43	3,46	3,34
Índice de Bostwick (cm/60s)	8,75	6,25	7,25	2	3,25

5.5.2.3 Avaliação da estabilidade dos preparados FruitOnly

Industrialmente, depois da elaboração dos preparados de fruta, estes são colocados em contentores e transportados para as empresas produtoras de iogurtes. Desta forma, alguns requerimentos são importantes que sejam atingidos pelos preparados, como a estabilidade de transporte e armazenamento, boa capacidade de bombagem e distribuição homogénea de pedaços de fruta. Neste trabalho, foi avaliada a presença de sinerese, estabilidade e distribuição homogénea dos pedaços nos preparados de morango e alperce. Os preparados de morango (P_F3 e Padrão_3), ao fim dos 40 dias, revelaram uma estabilidade reduzida. Em ambos os preparados, ocorreu uma desintegração estrutural, ocorrendo uma separação de fases. Apesar dos pedaços estarem distribuídos homogeneamente, a sua estabilidade não ocorreu devido a uma diferença de densidades. Desta forma, o preparado P_F3 com a polpa funcionalizada pela PME não foi capaz de garantir os critérios de qualidade para um preparado de fruta. É necessário o desenvolvimento da sua fórmula, garantindo uma viscosidade suficiente que estabilize o preparado num tempo máximo de 90 dias.

Relativamente aos preparados de alperce (P_F3 e Padrão 2), foi possível verificar que ambos apresentaram uma distribuição homogénea e estabilidade dos pedaços. No entanto, o preparado Padrão 2 apresentou uma tendência de sinerese na superfície. O preparado P_F3 permitiu que esta libertação de água não ocorresse, resultado da estabilidade do gel formado pelas pectinas desesterificadas presentes na polpa funcionalizada com PME.

5.5.2.4 Análise Sensorial

O processo da análise sensorial é bastante útil durante a fase de desenvolvimento de um produto, porque desta forma é possível reestruturar a sua fórmula e melhorar algumas características sensoriais que apresentam preferência pelo futuro consumidor. O teste sensorial aqui realizado foi o de preferência pareada, pretendendo-se avaliar se o consumidor gosta ou não gosta de um produto através da sua preferência. No entanto, este teste apresenta uma desvantagem dado que leva a uma resposta obrigatória pelo consumidor mesmo que este não aprecie nenhuma das amostras.

Relativamente à análise sensorial dos preparados de morango com pedaços, optou-se por fazer o teste com os preparados que apresentavam uma proporção de 45% de polpa e 40% de pedaços de morango, ou seja, entre o preparado tipo 2 que apresentava a adição de aditivos e o preparado P_F3 com a polpa de morango funcionalizada. Todos os 30 provadores preferiram a amostra referente ao iogurte que continha o preparado de morango com pedaços funcionalizado (P_F3) (**Figura 26-A**). Através deste resultado e comparando o número de amostras considerada preferida pelos provadores, constata-se, com o nível de significância utilizado para este teste, que o preparado de morango *FruitOnly* (P_F3) aplicado a iogurte apresenta uma preferência significativa quando comparado com o Preparado tipo 2. Dentro das respostas fornecidas pelo painel, o iogurte com o preparado P_F3 mostrou uma sensação de frescura, acidez e doçura em relação ao preparado tipo 2, sendo que este revelou um sabor mais amargo. Ao nível da visão apresentava um cor-de-rosa mais vivo, o que é vantajoso uma vez que não apresenta nenhum corante na sua constituição, enquanto o iogurte com o preparado tipo 2 apresentava uma cor mais oxidada. Além disto, revelaram que o P_F3 apresentava uma sensação maior de sabor a fruta de morango, sentindo-se mais a intensidade do seu aroma. A viscosidade e a textura do iogurte com o preparado *FruitOnly* foram aceitáveis.

No teste de comparação pareada entre os preparados de pedaços de alperce, foram comparados os preparados com a proporção de 45:40:13, ou seja, polpa, pedaços de alperce e açúcar, respetivamente. Foram dados a provar o preparado tipo 2, com a aplicação de aditivos e o P_F3 com a polpa de alperce funcionalizada com a PME durante 20 minutos. Dos 30 provadores, 25 mostraram preferência pelo iogurte que continha o preparado tipo 2 (**Figura 26-B**). Pelos resultados desta análise sensorial verifica-se, com um nível de significância de 0,05, que existe uma preferência significativa entre uma das

duas amostras, sendo a mais preferida a que contém o iogurte com o Preparado tipo 2. Dentro das respostas fornecidas pelos provadores, estes indicaram que o P_F3 era mais fresco e tinha uma maior intensidade de sabor a fruta. Ao nível da cor revelaram que o iogurte com o P_F3 era menos corado que o iogurte com o preparado tipo 2. Relativamente ao sabor, o painel mostrou preferência pela doçura e sabor agradável do preparado tipo 2, revelando que o iogurte com o P_F3 era mais ácido, amargo e sem sabor. Uma vez que não puseram em causa a viscosidade nem a textura da amostra, mas sim a sua adstringência, seria preferível um novo desenvolvimento com uma variada diferente de alperce. Desta forma, mantinha-se e valorizava-se as características otimizadas do preparado de fruta.

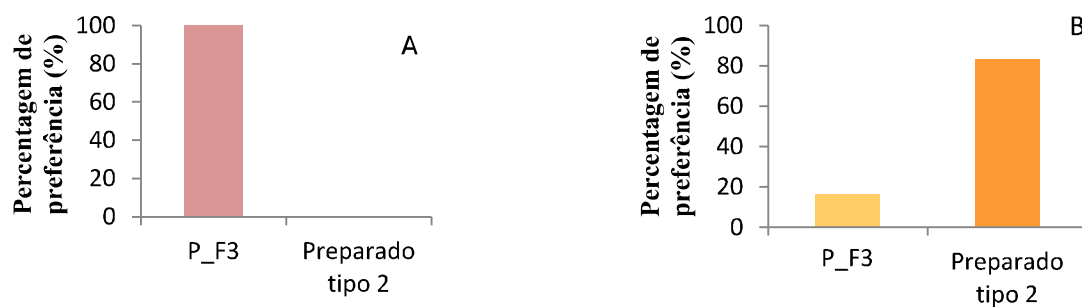


Figura 26 - Gráfico da percentagem de preferência de cada preparado com pedaços de morango (A) e alperce (B)

6 Conclusão

Na caracterização das polpas comerciais sem tratamento, verificou-se que o aumento da concentração de uma suspensão de polpa aumentava de uma forma exponencial a sua viscosidade, sendo o Marmelo o fruto com maior viscosidade. Quando submetidas aos tratamentos com 0,1% (m/m) PME, com a adição de 1% (m/m) de CaCl_2 e na presença da PME com CaCl_2 , as polpas comerciais mostraram resultados distintos. Verificou-se a gelificação das polpas de Morango_5, Maçã, Marmelo e Manga quando foram incubadas com a enzima PME na presença de CaCl_2 , sendo estas as polpas que já apresentavam uma maior viscosidade sem tratamento. Neste caso, pode-se sugerir para ensaios futuros uma redução da adição da quantidade de CaCl_2 , estudando uma gama de concentração, para cada polpa, que permita o aumento da viscosidade sem chegar à fase de gelificação. De uma forma geral, os tratamentos mostraram vantagens de utilização em todas as polpas, sendo o tratamento com CaCl_2 o melhor para as polpas de Morango_5 e Manga e a ação da PME para as polpas de Maçã, Marmelo, Mirtilo e Limão. O CaCl_2 na presença da PME revelou ser o mais eficaz no tratamento para a polpa de Morango_1 e Kiwi, sendo duas polpas que apresentam valores de viscosidade relativamente baixos quando não sujeitas a tratamento. Através da suspensão de pedaços de morango, por estas polpas comerciais, foi possível verificar que em todas a presença dos tratamentos mostrou, mais uma vez, vantagens relativamente à polpa sem tratamento. Desta forma, com uma menor concentração de polpa foi possível garantir uma estabilidade de pedaços elevada.

As polpas de Morango e Alperce transformadas a partir de frutos frescos mostraram resultados semelhantes quando sujeitas ou não ao processo de pasteurização e na presença ou ausência de tratamentos. Estas revelaram uma diminuição da viscosidade, quer no controlo quer na presença de tratamentos, quando foram sujeitas a uma pasteurização prévia. A polpa de Morango revelou sofrer perda de funcionalidade quando sujeita à pasteurização, uma vez que a aplicação do tratamento com a PME não alterou significativamente a viscosidade em relação ao controlo, contrariamente ao resultado obtido pela polpa não pasteurizada. De igual modo, a polpa de Alperce apresentou vantagens quando aplicado o tratamento da PME à polpa não pasteurizada. Ambas as polpas, quer pasteurizadas ou não, mostraram gelificação com o tratamento do CaCl_2 na presença de PME.

Através do estudo de otimização da PME a diferentes tempos e temperaturas de incubação foi possível chegar a uma gama de temperaturas e tempo em que a viscosidade final das polpas era constante. O ensaio mostrou, para a polpa de Morango, que a viscosidade final era máxima quando a enzima atuava durante 60 minutos, e que não apresentava diferenças significativas na gama de temperaturas estudada (30 - 50°C). Por outro lado, a viscosidade da polpa de alperce mostrou ser constante nos diferentes tempos e temperaturas aplicados (40 e 50°C).

A aplicação das polpas de morango e alperce sujeitas ao tratamento enzimático mostrou um elevado interesse, uma vez que se conseguiu aumentar a sua viscosidade sem introduzir qualquer tipo de espessante como aditivo. Estas polpas foram aplicadas em preparados à base de fruta, edulcorados e açucarados, e tentou-se perceber o seu comportamento quando sofriam ou não pasteurização após o tratamento com a PME. De uma forma geral, a pasteurização da polpa de morango após o tratamento com a enzima não mostrou ser vantajosa. Com o objetivo de minimizar ou evitar a aplicação de aditivos, a polpa de morango não pasteurizada mostrou vantagens quando inserida num preparado de polpa açucarado, uma vez que com a redução de 80% do aditivo amido foi capaz de obter uma consistência semelhante ao preparado industrial com amido. Por outro lado, a aplicação da polpa de morango no preparado edulcorado não apresentou resultados satisfatórios. Em relação à polpa de alperce não pasteurizada, a sua aplicação num preparado de polpa açucarado mostrou ser muito favorável, isto porque apresentou um índice de Bostwick semelhante ao preparado industrial, reduzindo em 100% o uso de amido. Por outro lado, a polpa de alperce pasteurizada permitiu reduzir 80% da quantidade de amido no preparado açucarado. A aplicação da polpa de alperce não pasteurizada no preparado edulcorado, ao contrário da polpa de morango, mostrou conseguir diminuir em 80% a adição do amido.

No desenvolvimento dos preparados *FruitOnly*, o melhor resultado para a aplicação da polpa de morango funcionalizada com a PME foi a proporção de 45% de polpa, 40% de pedaços de morango e 13% de açúcar, sendo a restante percentagem água e sorbato de potássio. Com este preparado foi possível obter um índice de Bostwick semelhante ao preparado que continha espessantes e estabilizantes. Em relação à aplicação da polpa de alperce funcionalizada, esta, ao contrário da polpa de morango, apresentou vantagens quando incorporada num preparado com uma proporção de 20% de polpa, 60% de pedaços

de alperce e 18% de açúcar, uma vez que obteve uma consistência ligeiramente maior ao do preparado com aditivos. A sua aplicação num preparado com a proporção de 45:40:13 (polpa, pedaços e açúcar, respetivamente) mostrou apresentar um índice de Bostwick bastante mais baixo que o preparado tipo de referência. Com isto, verifica-se que a aplicação das polpas funcionalizadas, de morango e alperce, em preparados de fruta com pedaços é bastante favorável. Conseguiu-se evitar na totalidade o uso de espessantes e estabilizantes para garantir consistências semelhantes aos preparados com aditivos, valorizando apenas as propriedades funcionais das próprias frutas. Foi possível atingir o objetivo da elaboração de preparados de fruta com pedaços o mais *clean label* possível, adicionando apenas 5 ingredientes na sua fórmula, sendo que 80% representam fruta. O preparado de alperce revelou uma estabilidade de pedaços elevada e ausência de sinerese pelo menos durante 40 dias, ao contrário do preparado de morango *FruitOnly* que não se mostrou estável. Através da análise sensorial, o iogurte com o preparado de morango *FruitOnly* mostrou ser o preferido pelo painel de provadores, sendo a percentagem de preferência 100%. Por outro lado, o preparado de alperce *FruitOnly* revelou apenas uma percentagem de preferência de $\approx 17\%$, indicando que é necessário ainda o desenvolvimento na sua fórmula. Neste último caso, uma vez que os provadores consideraram um sabor amargo no preparado, poder-se-ia sugerir a substituição por outra variedade de alperce.

Seria interessante, em ensaios futuros, estudar o efeito dos preparados *FruitOnly* na consistência do iogurte, isto porque a presença de iões cálcio no iogurte poderá interagir com os polissacarídeos pécticos desesterificados da polpa. Além disto, poder-se-ia verificar a aplicação da PME em mais frutos frescos, aumentando assim a gama de preparados *FruitOnly*, bem como o seu uso em preparados de fruta já existentes industrialmente mas com outro tipo de aplicação, como pastelaria, gelados ou bebidas.

7 Referências

- [1]. Thakur BR, Singh RK, Handa AK, Rao MA. Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1997;37(1):47-73.
- [2]. Imeson A. *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. First ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2010.
- [3]. Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen JD. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*. 2006;17(3):97-104.
- [4]. Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. 2001;77(3):215-227.
- [5]. Alkorta I, Garbisu C, Llama MJ, Serra JL. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. 1998;33(1):21-28.
- [6]. Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. 2005;40(9):2931-2944.
- [7]. Fraeye I, Duvetter T, Doungra E, Van Loey A, Hendrickx M. Fine-tuning the properties of pectin–calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(5):219-228.
- [8]. Imeson A. *Thickening and Gelling Agents for Food*. Second ed. Great Britain: Blackie Academic and Professional; 1997.
- [9]. Slavov A, Garnier C, Crepeau MJ, Durand S, Thibault JF, Bonnin E. Gelation of high methoxy pectin in the presence of pectin methylesterases and calcium. *Carbohydrate Polymers*. 2009;77(4):876-884.
- [10]. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008;11(3):266-277.
- [11]. Sriamornsak P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn University International Journal*. 2003;3(1-2):206-228.
- [12]. Willats WT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. 2001;47(1-2):9-27.
- [13]. Ngouémazong DE, Tengweh FF, Fraeye I, Duvetter T, Cardinaels R, Van Loey A, Moldenaers P, Hendrickx M. Effect of de-methylesterification on network development and nature of Ca²⁺-pectin gels: Towards understanding structure–function relations of pectin. *Food Hydrocolloids*. 2012;26(1):89-98.
- [14]. Caffall KH, Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 2009;344(14):1879-1900.
- [15]. Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek G-JWM, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP. Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls: Implications for Pectin Methyl Esterase Action, Matrix Properties, and Cell Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(22):19404-19413.
- [16]. Sila DN, Van Buggenhout S, Duvetter T, Fraeye I, De Roeck A, Van Loey A, Hendrickx M. Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II—Structure–Function Relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2009;8(2):86-104.
- [17]. Souza JVB, Silva ÉS, Maia MLS, Teixeira MFS. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peecilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1. *Process Biochemistry*. 2003;39(4):455-458.
- [18]. Gerrish TC, Chambliss KL, Forman SC, inventors; CP Kelco ApS, assignee. Low Methoxyl Pectin, Processes Thereof, and Stabilized Aqueous Systems Comprising the Same patent US 6,699,977 B1. Mar. 2, 2004.
- [19]. Ovodov YS. Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2009;35(3):269-284.
- [20]. Stephen AM, Philips GO, Williams PA. *Food Polysaccharides and Their Applications*. Second ed: CRC Press; 2006.

- [21]. Sinitsya A, Čopíková J, Prutyanov V, Skoblya S, Machovič V. Amidation of highly methoxylated citrus pectin with primary amines. *Carbohydrate Polymers*. 2000;42(4):359-368.
- [22]. Canteri MHG, Moreno L, Wosiacki G, Scheer AdP. Pectina: da matéria-prima ao produto final. *Polímeros*. 2012;22:149-157.
- [23]. Europeia C. Regulamento (UE) N° 1129/2011. *Jornal Oficial União Europeia*; 2011.
- [24]. FAO/WHO. Codex General Standard For Food Additives CODEX STAN 192 - 1995. 1995.
- [25]. Maxwell EG, Belshaw NJ, Waldron KW, Morris VJ. Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science & Technology*. 2012;24(2):64-73.
- [26]. Jarvis MC, Apperley DC. Chain conformation in concentrated pectic gels: evidence from ¹³C NMR. *Carbohydrate Research*. 1995;275(1):131-145.
- [27]. Fraeye I, Doungra E, Duvetter T, Moldenaers P, Van Loey A, Hendrickx M. Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin–calcium gels. *Food Hydrocolloids*. 2009;23(8):2069-2077.
- [28]. Kastner H, Einhorn-Stoll U, Senge B. Structure formation in sugar containing pectin gels – Influence of Ca²⁺ on the gelation of low-methoxylated pectin at acidic pH. *Food Hydrocolloids*. 2012;27(1):42-49.
- [29]. El-Nawawi SA, Heikel YA. Factors affecting gelation of high-ester citrus pectin. *Process Biochemistry*. 1997;32(5):381-385.
- [30]. Tsoga A, Richardson RK, Morris ER. Role of cosolutes in gelation of high-methoxy pectin. Part 1. Comparison of sugars and polyols. *Food Hydrocolloids*. 2004;18(6):907-919.
- [31]. Tsoga A, Richardson RK, Morris ER. Role of cosolutes in gelation of high-methoxy pectin. Part 2. Anomalous behaviour of fructose: calorimetric evidence of site-binding. *Food Hydrocolloids*. 2004;18(6):921-932.
- [32]. Phillips GO, Williams PA. *Handbook of Hydrocolloids*. Second ed. North America: CRC Press LLC, 6000 Broken Sound Parkway, NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487, USA; 2009. 274-297 p.
- [33]. Visser J, Voragen AGJ. *Pectins and Pectinases*: Elsevier Science B.V.; 1995. 21-33 p.
- [34]. Braccini I, Pérez S. Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*. 2001;2(4):1089-1096.
- [35]. Morris ER, Rees DA, Thom D, Boyd J. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydrate Research*. 1978;66(1):145-154.
- [36]. Morris ER, Powell DA, Gidley MJ, Rees DA. Conformations and interactions of pectins: I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *Journal of Molecular Biology*. 1982;155(4):507-516.
- [37]. Liners F, Thibault JF, Vancutsem P. Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal-antibodies. *Plant Physiology*. 1992;99(3):1099-1104.
- [38]. Luzio GA, Cameron RG. Demethylation of a model homogalacturonan with the salt-independent pectin methylesterase from citrus: Part II. Structure–function analysis. *Carbohydrate Polymers*. 2008;71(2):300-309.
- [39]. Willats WGT, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek G-J, Benen J, Christensen TMIE, Visser J, Voragen A, Mikkelsen JD, Knox JP. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research*. 2000;327(3):309-320.
- [40]. Cardoso SM, Coimbra MA, Lopes da Silva JA. Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydrate Polymers*. 2003;52(2):125-133.
- [41]. Capel F, Nicolai T, Durand D, Boulenguer P, Langendorff V. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*. 2006;20(6):901-907.
- [42]. Cárdenas A, Goycoolea FM, Rinaudo M. On the gelling behaviour of ‘nopal’ (*Opuntia ficus indica*) low methoxyl pectin. *Carbohydrate Polymers*. 2008;73(2):212-222.

- [43]. Fraeye I, Colle I, Vandevenne E, Duvetter T, Van Buggenhout S, Moldenaers P, Van Loey A, Hendrickx M. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2010;11(2):401-409.
- [44]. Grosso CRF, Rao MA. Dynamic rheology of structure development in low-methoxyl pectin+Ca²⁺+sugar gels. *Food Hydrocolloids*. 1998;12(3):357-363.
- [45]. Ralet M-C, Dronnet V, Buchholt HC, Thibault J-F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research*. 2001;336(2):117-125.
- [46]. Löfgren C, Guillotin S, Hermansson A-M. Microstructure and Kinetic Rheological Behavior of Amidated and Nonamidated LM Pectin Gels. *Biomacromolecules*. 2005;7(1):114-121.
- [47]. Capel F, Nicolai T, Durand D, Boulenguer P, Langendorff V. Influence of Chain Length and Polymer Concentration on the Gelation of (Amidated) Low-Methoxyl Pectin Induced by Calcium. *Biomacromolecules*. 2005;6(6):2954-2960.
- [48]. Diaz JV, Anthon GE, Barrett DM. Nonenzymatic Degradation of Citrus Pectin and Pectate during Prolonged Heating: Effects of pH, Temperature, and Degree of Methyl Esterification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(13):5131-5136.
- [49]. Van Buggenhout S, Sila DN, Duvetter T, Van Loey A, Hendrickx M. Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part III—Texture Engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2009;8(2):105-117.
- [50]. Zheng Z, Shetty K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochemistry*. 2000;35(8):825-830.
- [51]. Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Carmona EC. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*. 2009;3:9-18.
- [52]. Shen Z, Manning G, Reese JC, Reeck GR. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Purification and characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1999;29(3):209-214.
- [53]. Micheli F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*. 2001;6(9):414-419.
- [54]. Uenojo M, Pastore GM. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*. 2007;30:388-394.
- [55]. Seegmiller CG, Jansen EF. Polymethylgalacturonase an enzyme causing the glycosidic hydrolysis of esterified pectic substances. *The Journal of Biological Chemistry*. 1952;195(1):327-333. Epub 1952/03/01.
- [56]. Lobanok AG, Mikhailova RV, Saiunova LI. Kinetics of constitutive synthesis of polymethylgalacturonases by *Penicillium digitatum* as a function of the carbon source and pH. *Mikrobiologiya*. 1977;46(5):920-925.
- [57]. Mayans O, Scott M, Connerton I, Gravesen T, Benen J, Visser J, Pickersgill R, Jenkins J. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure*. 1997;5(5):677-689.
- [58]. Coimbra MA, Waldron KW, Delgadillo I, Selvendran RR. Effect of Processing on Cell Wall Polysaccharides of Green Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996;44(8):2394-2401.
- [59]. Nunes C, Santos C, Pinto G, Silva S, Lopes-da-Silva JA, Saraiva JA, Coimbra MA. Effects of ripening on microstructure and texture of “Ameixa d’Elvas” candied plums. *Food Chemistry*. 2009;115(3):1094-1101.
- [60]. Duan X, Cheng G, Yang E, Yi C, Ruenroengklin N, Lu W, Luo Y, Jiang Y. Modification of pectin polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit. *Food Chemistry*. 2008;111(1):144-149.
- [61]. Jordi P, Qi W, John S. Pectin from Fruits. *Functional Foods - Biochemical and Processing Aspects*: CRC Press; 2002.

- [62]. Kunzek H, Kabbert R, Gloyna D. Aspects of material science in food processing: changes in plant cell walls of fruits and vegetables. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1999;208(4):233-250.
- [63]. Revilla I, González-San José ML. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International Journal of Food Science & Technology*. 2003;38(1):29-36.
- [64]. De Roeck A, Duvetter T, Fraeye I, Plancken IVd, Sila DN, Loey AV, Hendrickx M. Effect of high-pressure/high-temperature processing on chemical pectin conversions in relation to fruit and vegetable texture. *Food Chemistry*. 2009;115(1):207-213.
- [65]. Krall SM, McFeeters RF. Pectin hydrolysis: Effect of temperature, degree of methylation, pH, and calcium on hydrolysis rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;46(4):1311-1315.
- [66]. Fraeye I, De Roeck A, Duvetter T, Verlent I, Hendrickx M, Van Loey A. Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation. *Food Chemistry*. 2007;105(2):555-563.
- [67]. Kravtchenko TP, Arnould I, Voragen AGJ, Pilnik W. Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical beta-elimination in aqueous-solution. *Carbohydrate Polymers*. 1992;19(4):237-242.
- [68]. Timmermans RAH, Mastwijk HC, Knol JJ, Quataert MCJ, Vervoort L, der Plancken IV, Hendrickx ME, Matser AM. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2011;12(3):235-243.
- [69]. Tromp RH, de Kruif CG, van Eijk M, Rolin C. On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin. *Food Hydrocolloids*. 2004;18(4):565-572.
- [70]. Grassin CMT, Fauquembergue PCL, inventors; Gist Brocades, N. V., Ma Delft, Netherlands, assignee. Pectinesterase in the treatment of fruit and vegetables patent US005639494A. Aug. 17, 1999.
- [71]. Mintel Group Lda. [database on the Internet]. Health claims & NPD - The impact of the EFSA health claims process on food & drink NPD. 2012 [cited 15-04-2013].
- [72]. Mintel Group Lda. [database on the Internet]. What is “natural” in food & drink? 2013 [cited 15-04-2013].
- [73]. Mintel Food and Drink [database on the Internet]. 2013 [cited 15-04-2013]. Available from: <http://www.gnpd.com/sinatra/gnpd/frontpage/>.
- [74]. Christiaens S, Mbong VB, Van Buggenhout S, David CC, Hofkens J, Van Loey AM, Hendrickx ME. Influence of processing on the pectin structure–function relationship in broccoli purée. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2012;15(0):57-65.
- [75]. Balestra F, Cocci E, Marsilio G, Rosa MD. Physico-chemical and rheological changes of fruit purees during storage. *Procedia Food Science*. 2011;1(0):576-582.
- [76]. Ros JM, Schols HA, Voragen AGJ. Extraction, characterisation, and enzymatic degradation of lemon peel pectins. *Carbohydrate Research*. 1996;282(2):271-284.
- [77]. Le Bourvellec C, Bouzerzour K, Ginies C, Regis S, Plé Y, Renard CMGC. Phenolic and polysaccharidic composition of applesauce is close to that of apple flesh. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011;24(4–5):537-547.
- [78]. Thomas M, Thibault JF. Cell-wall polysaccharides in the fruits of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*): extraction and preliminary characterisation. *Carbohydrate Polymers*. 2002;49(3):345-355.
- [79]. Heng Koh T, Melton LD. Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology*. 2002;26(1):23-33.
- [80]. Femenia A, Sastre-Serrano G, Simal S, Garau MC, Eim VS, Rosselló C. Effects of air-drying temperature on the cell walls of kiwifruit processed at different stages of ripening. *LWT - Food Science and Technology*. 2009;42(1):106-112.
- [81]. Ros JM, Schols HA, Voragen AGJ. Lemon albedo cell walls contain distinct populations of pectic hairy regions. *Carbohydrate Polymers*. 1998;37(2):159-166.

- [82]. Renard CMGC, Baron A, Guyot S, Drilleau JF. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2001;29(2):115-125.
- [83]. Legentil A, Guichard I, Piffaut B, Haluk JP. Characterization of strawberry pectin extracted by chemical means. *LWT - Food Science and Technology*. 1995;28(6):569-576.
- [84]. Koubala BB, Kansci G, Mbome LI, Crépeau MJ, Thibault JF, Ralet MC. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels. *Food Hydrocolloids*. 2008;22(7):1345-1351.
- [85]. Deng; J, Shi; Z-J, Li; X-Z, Liu H-M. Soluble Polysaccharides Isolation and Characterization from Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*) Fruits. *BioResoures*. 2013;8(1):405-419.
- [86]. Vicente AR, Ortugno C, Rosli H, Powell ALT, Greve LC, Labavitch JM. Temporal Sequence of Cell Wall Disassembly Events in Developing Fruits. 2. Analysis of Blueberry (*Vaccinium* Species). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(10):4125-4130.
- [87]. Guedes; DB, Ramos; AM, Diniz MDMS. Effect of temperature and concentration on the physical properties of watermelon pulp. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2010;13(4):279-285.
- [88]. Keshani; S, Chuan; AL, Russly; AR. Effect of temperature and concentration on rheological properties pomelo juice concentrates. *International Food Research Journal*. 2012;19(2):553-562.
- [89]. Kar F, Arslan N. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers*. 1999;40(4):277-284.
- [90]. Magerramov MA, Abdulagatov AI, Azizov ND, Abdulagatov IM. Effect of temperature, concentration, and pressure on the viscosity of pomegranate and pear juice concentrates. *Journal of Food Engineering*. 2007;80(2):476-489.
- [91]. Jacops; LL, Lemmens-Smink; NV, Passard; VY, inventors; Mars Incorporated, McLean, VA, assignee. Fruit Snack patent 2008/0014303 A1. Jan. 17, 2008.
- [92]. McCarthy JG, inventor; Nestec S.A., Vevey, Switzerland, assignee. Treatment of Fruits and Vegetables patent US005869122A. Feb. 9, 1999.
- [93]. Proctor A, Miesle TJ. Poligalacturonase and Pectinmethylesterase activities in developing highbush blueberries. *Hortscience*. 1991;26(5):579-581.
- [94]. Fernández-Bolaños J, Heredia A, Saldaña C, Rodríguez R, Guillén R, Jiménez A. Effect of dressings "(aliños)" on olive texture: cellulase, polygalacturonase and glycosidase activities of garlic and lemon present in brines. *European Food Research and Technology*. 2001;212(4):465-468.
- [95]. Kuldiloke J, Eshtiaghi M, Zenker M, Knorr D. Inactivation of Lemon Pectinesterase by Thermosonication. *International Journal of Food Engineering*. 2007;3(2).
- [96]. Macdonald HM, Evans R, Spencer WJ. Purification and properties of the major pectinesterases in lemon fruits (*Citrus limon*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1993;62(2):163-168.
- [97]. Oliveira; RCd, Rossi; RM, Barros; STDD. Rheological study of strawberry pulp (*Fragaria vesca*) at different temperatures. *Acta Scientiarum Technology*. 2012;34(3):283-288.
- [98]. Guerrero SN, Alzamora SM. Effect of pH, temperature and glucose addition on flow behaviour of fruit purées I. Banana purée. *Journal of Food Engineering*. 1997;33(3–4):239-256.
- [99]. Femenia A, Sánchez ES, Simal S, Rosselló C. Developmental and ripening-related effects on the cell wall of apricot (*Prunus armeniaca*) fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998;77(4):487-493.
- [100]. Femenia A, Sánchez ES, Simal S, Rosselló C. Modification of Cell Wall Composition of Apricots (*Prunus armeniaca*) during Drying and Storage under Modified Atmospheres. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;46(12):5248-5253.

- [101]. Colin-Henrion M, Mehinagic E, Renard CMGC, Richomme P, Jourjon F. From apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cell wall polysaccharides. *Food Chemistry*. 2009;117(2):254-260.
- [102]. Bengtsson H, Wikberg J, Tornberg EVA. Physicochemical characterization of fruit and vegetable of fruit and vegetable fiber suspensions. II: Effect of variations in heat treatment. *Journal of Texture Studies*. 2011;42(4):281-290.
- [103]. Ng A, Waldron KW. Effect of Cooking and Pre-Cooking on Cell-Wall Chemistry in Relation to Firmness of Carrot Tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1997;73(4):503-512.
- [104]. O'Brien AB, Philp K, Morris ER. Gelation of high-methoxy pectin by enzymic de-esterification in the presence of calcium ions: a preliminary evaluation. *Carbohydrate Research*. 2009;344(14):1818-1823.
- [105]. Kapdan IK, Kargi F, Oztekin R. Effects of operating parameters on acid hydrolysis of ground wheat starch: Maximization of the sugar yield by statistical experiment design. *Starch - Stärke*. 2011;63(5):311-318.
- [106]. Bej; B, Basu; RK, Ash; SN. Kinetic studies on acid catalysed hydrolysis of starch. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2008;67(4):295-298.
- [107]. Silva FVM, Martins RC, Silva CLM. Design and Optimization of Hot-Filling Pasteurization Conditions: Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) Fruit Pulp Case Study. *Biotechnology Progress*. 2003;19(4):1261-1268.
- [108]. De Roeck A, Sila DN, Duvetter T, Van Loey A, Hendrickx M. Effect of high pressure/high temperature processing on cell wall pectic substances in relation to firmness of carrot tissue. *Food Chemistry*. 2008;107(3):1225-1235.
- [109]. Silva; RRd, Hecktheuer; LHR, Suertegaray; AB, Flores; D, Nora; FD, Bizzani; M, Mença; RC, Silva SCd. Análise de comparação pareada entre cervejas com diferentes teores alcoólicos: Universidade Federal de Santa Maria; 2012.

8 Anexos

8.1 – Tabela dos níveis de significância para o teste de comparação pareada [109]

Número mínimo de respostas corretas para estabelecer diferença significativa entre as amostras em vários níveis de significância.

Número de respostas	Níveis de significância						
	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,1%
7	7	7	7	7	7		
8	7	7	8	8	8	8	
9	8	8	8	8	9	9	
10	9	9	9	9	10	10	10
11	9	9	10	10	10	11	11
12	10	10	10	10	11	11	12
13	10	11	11	11	12	12	13
14	11	11	11	12	12	13	13
15	12	12	12	12	13	13	14
16	12	12	13	13	14	14	15
17	13	13	13	14	14	15	16
18	13	14	14	14	15	15	16
19	14	14	15	15	15	16	17
20	15	15	15	16	16	17	18
21	15	15	16	16	17	17	18
22	16	16	16	17	17	18	19
23	16	17	17	17	18	19	20
24	17	17	18	18	19	20	20
25	18	18	18	19	19	20	21
26	18	18	19	19	20	20	22
27	19	19	19	20	20	21	22
28	19	20	20	20	21	22	23
29	20	20	21	21	22	22	24
30	20	21	21	22	22	23	24
31	21	21	22	22	23	24	25
32	22	22	22	23	24	24	26
33	22	23	23	23	24	25	26
34	23	23	23	24	25	25	27
35	23	24	24	25	25	26	27
36	24	24	25	25	26	27	28
37	24	25	25	26	26	27	29
38	25	25	26	26	27	28	29
39	26	26	26	27	28	28	30
40	26	27	27	27	29	29	30
41	27	27	27	28	29	30	31
42	27	28	28	29	29	30	32
43	28	28	29	29	30	31	32
44	28	29	29	30	31	31	33
45	29	29	30	30	31	32	34
46	30	30	30	31	32	33	34
47	30	30	31	31	32	33	35
48	31	31	31	32	33	34	36
49	31	32	32	33	34	34	36
50	32	32	33	33	34	35	37
60	37	38	38	39	40	41	43
70	43	43	44	45	46	47	49
80	48	49	49	50	51	52	55
90	54	54	55	56	57	58	61
100	59	60	60	61	63	64	66

Fonte: O'MAHONY (1996)

Nota: Para valores de n que não constam da Tabela, consultar MEIGAARD et al. (1991), p. 339.